

10/524970

PCT/JP 03/10461

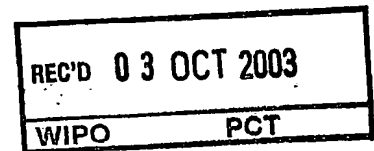
日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

19.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 8月20日



出 願 番 号
Application Number: 特願2002-239979
[ST. 10/C]: [JP2002-239979]

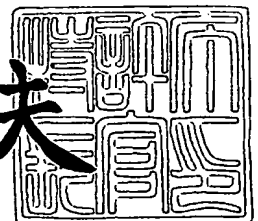
出 願 人
Applicant(s): 入村 達郎
住友商事株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 SS1-006

【提出日】 平成14年 8月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都世田谷区桜新町2丁目27番9号603号室

 【氏名】 入村 達郎

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都杉並区和田2-45-9 メゾンドスサーナ106

 【氏名】 前沼 圭佐

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都目黒区洗足1-11-15 木原方

 【氏名】 小松 邦光

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県美浜区真砂3-18-3-906

 【氏名】 立木 あゆみ

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市幸区小倉1丁目1番E棟216号

 【氏名】 松本 真理子

【特許出願人】

 【識別番号】 501069968

 【氏名又は名称】 入村 達郎

【特許出願人】

 【識別番号】 501069979

 【氏名又は名称】 松本 真理子

【代理人】

【識別番号】 100106002

【弁理士】

【氏名又は名称】 正林 真之

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 058975

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 血清又は細胞診断方法及びそのためのレクチン

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 複数の種類のレクチンから、細胞若しくは擬細胞体又は糖鎖（単糖を含む）を利用して選別した少なくとも 1 種類以上のレクチンを含む血清診断若しくは細胞診断・細胞識別用レクチンライブラリ。

【請求項 2】 O-結合型糖鎖を認識する遺伝子改変レクチンを少なくとも 1 種類以上含む血清診断若しくは細胞診断・細胞識別用レクチンライブラリ。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載のレクチンライブラリにおいて、I g A グライコフォーム識別用のレクチンライブラリ。

【請求項 4】 前記細胞診断・細胞識別用が、骨芽細胞亜集団識別用又は間葉系幹細胞由来の細胞亜集団識別用又は癌細胞転移性識別用のいずれかであることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のレクチンライブラリ。

【請求項 5】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のレクチンライブラリを用いた診断方法。

【請求項 6】 レクチンが被診断物の少なくとも 1 種類の親和性を利用して被診断物の識別を行うことを特徴とする請求項 5 の診断方法において、被診断物の少なくとももう 1 種類の親和性を利用して被診断物を表示することを特徴とする診断方法。

【請求項 7】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のレクチンライブラリを含む診断キット。

【請求項 8】 請求項 7 に記載のレクチンライブラリを含む診断キットにおいて、被診断物の少なくとも 2 種類の親和性に応じて検出可能な物を含むことを特徴とする診断キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、複数の種類のレクチンから所定の解析能を有するレクチンを選別する方法及びその方法で選別されたレクチンに関する。

【0002】

【従来の技術】

近年の糖鎖工学の進歩は目ざましく、細胞の安定化に寄与する植物細胞の細胞壁のプロテオグリカン、細胞の分化、増殖、接着、移動等に影響を与える糖脂質、及び、細胞間相互作用や細胞認識に関与している糖タンパク質等の高分子の糖鎖が、互いに機能を代行、補助、増幅、調節、あるいは、阻害し合いながら高度で精密な生体反応を制御する機構が明らかにされようとしている。また、細胞表面の糖鎖や、糖鎖-レセプター間の相互作用異常による疾病の発生、あるいは、エイズなどのウイルス感染における糖鎖の役割等に関して盛んに研究されている。

【0003】

特に、正常細胞と癌細胞、あるいは分化段階の異なる細胞など、ある細胞を他の細胞と分別し同定するために、細胞がその表面に持つ糖鎖を利用でき、例えば、癌細胞については悪性度の変化に応じて、幹細胞についてはその分化段階により変化するといったような報告が数多くなされている。以上のように、糖鎖に基づく解析（例えば、分別や同定）は、大変有意義であると考ええる。

【0004】

このような糖鎖解析の手段として、レクチンは大変有用であると考えられるが、天然に存在するレクチンの種類が限られ、また、レクチンが利用されやすいようになっているかが重要な関心事である。即ち、糖鎖解析で大きく期待されている微妙な違いを見分けるには、微妙な違い（グラディエーション）をもって段階的にレクチンが準備されるのが好ましいと考えられる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明の課題は、微妙な細胞等の違いが、その表面の糖鎖の違いに現れ、それを区別するのに役立つレクチンを調整することである。

【0006】

【発明を解決するための手段】

上記課題に鑑みて、本発明では、複数の種類のレクチンから所定の細胞等によ

るパニング又はその他の方法で、所定の解析能を有するレクチンを選別する。所定の解析能には、解析すべき細胞等と親和性が高いことと低いことを含むことができる。このようにして選別された1又はそれ以上のレクチンを用いて細胞等の解析を行うことができる。更に、これらのレクチンを含んだ診断薬又は診断キットを提供することができる。

【0007】

ここで、複数の種類のレクチンは、天然のレクチン又は人工のレクチン（遺伝子的に改変されたレクチンを含んでよい）の内いずれかだけを含んでよく、また、両者を含んでもよい。含まれる両者の比率は、特に限定されない。レクチンの選別を行うためのパニング等の方法にて使用する所定の細胞等には、解析対象となる細胞自身を含んでよく、細胞ではないが、上記複数の種類のレクチンと接触し得るところに糖鎖を有する擬細胞を含んでよい。従って、例えば細胞膜だけであってもここでいう所定の細胞等に含まれてよい。また、単糖を含む糖鎖であってもよい。

【0008】

天然のレクチンには、動物性のレクチン及び植物性のレクチン並びにその他のレクチンを含んでよく、植物性のレクチンには、マメ科のレクチンを含んでよい。マメ科のレクチンには、MAH由来のレクチンを含んでよい。人工のレクチンには、例えば、既知の化学的な手法を駆使して人工的に合成したレクチンを含んでもよいが、生物を利用して合成したレクチンを含んでよい。生物を利用して合成したレクチンには、培養やその他の既知の生物学的な手法により生成したレクチンを含んでよく、遺伝子工学を利用して生成したレクチンを含んでよい。遺伝子工学を利用して生成したレクチンには、所定の位置のDNAを操作（改変等）することにより生成したレクチンを含んでよい。

【0009】

より具体的に、本発明においては、以下のようなものを提供する。

【0010】

(1) 複数の種類のレクチンから、細胞若しくは擬細胞体又は糖鎖（単糖を含む）を利用して選別した少なくとも1種類以上のレクチンを含む血清診断若しく

は細胞診断・細胞識別用レクチンライブラリ。

【0011】

(2) O-結合型糖鎖を認識する遺伝子改変レクチンを少なくとも1種類以上含む血清診断若しくは細胞診断・細胞識別用レクチンライブラリ。

【0012】

(3) 上記(1)又は(2)に記載のレクチンライブラリにおいて、IgAグライコフォーム識別用のレクチンライブラリ。

【0013】

(4) 前記細胞診断・細胞識別用が、骨芽細胞亜集団識別用又は間葉系幹細胞由来の細胞亜集団識別用又は癌細胞転移性識別用のいずれかであることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載のレクチンライブラリ。

【0014】

(5) 上記(1)から(4)のいずれかに記載のレクチンライブラリを用いた診断方法。

【0015】

(6) レクチンが被診断物の少なくとも1種類の親和性を利用して被診断物の識別を行うことを特徴とする上記(5)の診断方法において、被診断物の少なくとももう1種類の親和性を利用して被診断物を表示することを特徴とする診断方法。

【0016】

(7) 上記(1)から(4)のいずれかに記載のレクチンライブラリを含む診断キット。

【0017】

(8) 上記(7)に記載のレクチンライブラリを含む診断キットにおいて、被診断物の少なくとも2種類の親和性に応じて検出可能な物を含むことを特徴とする診断キット。

【0018】

ここで、遺伝子的に改変されたレクチンは、元となるレクチンの遺伝子を遺伝子工学的に改変した遺伝子から生成されたレクチンを含んでよい。「改変」とは

、遺伝子の基本的構造は変えずに、変更を加えることを含んでよい。より具体的には、遺伝子を長くする遺伝子の挿入、遺伝子を短くする遺伝子の欠失、遺伝子の長さは変らない遺伝子の種類を変える遺伝子の変更又は改変（ランダム、任意的、恣意的なものを含む。以下「変更」。）等を含んでよい。更に、変更には、部分的に遺伝子若しくはアミノ酸を固定することを含んでよい。前記元のレクチンは、所定のレクチンであってよく、天然のレクチン又は人工のレクチンのいずれもよく、植物若しくは植物由来の又は動物若しくは動物由来のレクチンを含んでよい。細胞等を識別する糖鎖認識部位は、何らかの方法で糖鎖の異同を区別できる部位を含んでよく、特に、立体的な構造に基づいて糖鎖の異同を区別できる部位を含んでよい。また、この「部位」は、1又はそれ以上の箇所に分かれて存在してよい。別の箇所に分かれて存在する場合は、1箇所だけで糖鎖の異同を区別してよく、また、2箇所又はそれ以上の部位が共同して糖鎖の異同を区別してもよい。ここで、1箇所に存在することは、その部位が実質的に連続して存在していることを含んでよい。このような糖鎖認識部位は三次元構造を有してよく、この三次元構造は、立体的な構造を含んでよい。

【0019】

例えば、三次元構造の例を図1のモデルによって考えることができる。図1Aは、そのモデルの立体構造を示すものであり、図1Bは、それをより模式的に示したものである。図1Cは、更に、糖鎖との結合の様子を示している。この図から、ループCとDは、その間に糖鎖を挟み込み、所定の糖鎖に結合性を示すことにより、糖鎖の異同を認識すると考えられる。このような解析から、糖鎖認識部位として、ループC及びDを見出すことができるが、このような解析に限らず、その他の如何なる解析をも含んでよい。

【0020】

上記「マメ科のレクチン」は、複数のレクチンを含んでよい。特に、*Maackia amurensis* hemagglutinin(MAH)を含むことが好ましい。図2に、このMAHレクチンの塩基配列及びアミノ酸配列を示す。*Maackia amurensis* hemagglutinin(MAH)において、塩基配列の配列位置が466～498（アミノ酸配列相当では127～137）が、ループCのアミノ酸に対応する塩基配列位置で、塩基

配列の配列位置が721～780（アミノ酸配列相当では212～231）が、ループDのアミノ酸に対応する塩基配列と考えられ、このような領域が改変の対象領域として含まれてよい。また、ループDにおいて、より好ましくは、塩基配列の配列位置が742～756（アミノ酸配列相当では219～223）の領域が改変の対象として含まれてよい。例えば、図5に示すようなMAHのループCの場合では、上述のようなアミノ酸配列相当で、127～137の位置の前に、1～11の挿入位置が示されており、仮に9の位置にXが挿入されると同図のex. のような配列となる。尚、挿入以外に図6に示すように所定のアミノ酸を固定して残りのアミノ酸をランダムに改変することにより改変レクチンを生成することができる。この方法によれば、図に示すような莫大な数の種類のレクチンができることになる。また、図15に示すようなMAHのループDの場合では、上述のようなアミノ酸配列相当で、219～224の位置の前に、1～6の挿入位置が示されている。ここで、塩基配列は、開始コドンから数え、アミノ酸配列は、N末端アミノ酸基から数えた。また、図15に示すようなMAHのループDのアミノ酸の種類の変更（又は遺伝子の変更）の場合では、上述のようなアミノ酸配列相当で、219～223の位置で少なくとも1の種類の変更を行うこともできる。

【0021】

MAH以外のマメ科のレクチンでは、アミノ酸配列により各ループが規定される。これらループの中で、上記ループCとループDが糖鎖認識に関与しているといわれる。また、図2のMAHのアミノ酸の配列表で、ループDの位置が、3番目（一番下）の下線によって示されているが、その中でも、糖鎖との結合性に大きな影響を及ぼすと思われる5つのアミノ酸が四角で囲われている。尚、図中マル1は、Xho I (ctcgag) 制限酵素部位を、図中マル2は、Bgl II (agatct) 制限酵素部位を、図中マル3は、Spe I (actagt) 制限酵素部位を、示している。

【0022】

このようなレクチンライブラリは、病態における糖鎖の差異を識別することが期待される。ムチンは、気管、胃腸などの消化管、生殖腺などの内腔を覆う粘液の主要な糖タンパク質である。ムチンは、O-グリコシド結合を介してポリペプ

チド（コアタンパク質、アポムチン）に結合した多数のO-結合型糖鎖を持つ。ほとんどのムチンが多くの変換配列ドメインを持っている。これらの変換配列ドメインはセリン、スレオニンに富み、完成されたムチンでは、ほとんどのO-結合型糖鎖が付加している。MUC1 ムチン上に発現する糖鎖と癌の進行に伴う悪性挙動との関連も示唆されており、このようなレクチンライブラリは有効であると考えられる。たとえば、大腸癌においてMUC1 ムチン上に発現している糖鎖であるシアリルルイスX抗原の発現が多いほど癌細胞の浸潤などが起こり、悪性度が高く、シアリルルイスX抗原の発現量は5年生存率と逆相関していることが報告されている（Cancer Research 53, 3632-3637, August 1, 1993）。ムチンを含む細胞表層の糖質の変化が、細胞の癌化の一般的な特徴として認められている。これらの変化が、細胞の接着性の変化、あるいは転移のような癌細胞の異常な挙動、免疫による防御からの回避に関与していると考えられている。このことから、たとえば糖タンパク質であるムチンの糖鎖修飾度合いを測定することができれば、レクチンライブラリによる識別能と癌細胞の悪性度との相関関係が期待できると考えられる。ここでは改変しない野生型レクチン（wt）が図3に示すシアル酸を含むO-結合型糖鎖構造を認識するイヌエンジュマメレクチン（MAH）とその遺伝子改変レクチンをレクチンライブラリとして用いることができると考えられる。がんの転移においては上述ムチン構造のうち、シアル酸の役割が大きいと報告されているからである。ムチンに対する抗体でがんの悪性度を判別しようという試みはあるが、糖鎖は各組織の分化の各段階で時間的・空間的にその発現が厳密に制御されている。モノクローナル抗体は、特定のムチン抗原に高い特異性をもつが、この手法はある時点における糖鎖情報にすぎない。糖鎖の時間的、質的、量的な変化を見るために、糖鎖の種類と特異性の強弱を識別できるレクチンライブラリが、病態そのものの診断だけでなく、早期診断・予後診断・治療法への応用にも有用と考えられる。感染、炎症、がん、神経障害、アルツハイマーなど病態に伴う糖鎖の変化は上述のようなムチンに限らず、N-結合型糖鎖の変化を伴う疾患、糖タンパク質または糖脂質の糖鎖の変化を伴う疾患も報告されており、そのいずれに対しても糖鎖の時間的、質的、量的な変化を見るために、糖鎖の種類と特異性の強弱を識別できるレクチンライブラリは有用と考えら

れる。

【0023】

また、本発明では、複数種類のレクチンを含むレクチンから、糖鎖解析に必要なレクチンライブラリを選択及び形成することができる。また、形成されたレクチンライブラリを用いて糖鎖を持つ細胞および糖蛋白の同定を行うことができる。更に、細胞同定が簡便に行える表示方法を提供することができる。即ち、1種類のレクチンで糖鎖を特定することは困難であるが、種類の異なるレクチンを組合せたレクチンライブラリでは、糖鎖の特定も可能である。また、たとえ糖鎖の特定ができなくとも糖鎖の違いとして現れる細胞の違い（種類、正常・異常の区別等を含む）や糖蛋白質の糖修飾の違いや糖鎖をマーカーのようにぶら下げた物質の識別等の糖鎖識別ツールとして用いることができる。逆に、細胞の違いや糖蛋白の糖修飾の違いや糖鎖マーカーとの対応が明確であれば、糖鎖の構造に触れることなく、レクチンライブラリとの関係から、上述の細胞の違いや糖蛋白の糖修飾の違いや糖鎖マーカーを識別できることになる。

【0024】

ここで、細胞若しくは擬細胞体を利用した選別には、いわゆるパニングを含むことができる。パニングは、複数の種類のレクチンから構成されるレクチンの集合体に対して行つてよい。尚、レクチンライブラリの構成要素の一部が欠けていたとしても、全体としてレクチンライブラリの機能が保たれる場合は、レクチンライブラリに含むことができる。パニングには、糖鎖情報提供源として、ねたとする細胞や擬細胞、糖鎖（単糖を含む）等を用いてよい。この「ねた」は、識別若しくは診断の対象となる細胞やその他の糖鎖を有する物に類似するものが好ましいと考えられる。対象物がわずかに異なる糖鎖を有し、このわずかな違いを見分けるレクチンライブラリを取得することが主な目的となるからである。図7にパニングの様子を模式的に示す。まず複数の種類のレクチン12、22、32を発現しているファージ10、20、30の集合体を準備する。次に、表面に糖鎖50が発現している被診断物若しくはそれに類似の1例である細胞40により、親和性の高いレクチン12を発現しているファージ10を選択的に選別する。このファージの遺伝子を再び大腸菌に組み込んで増やし、同種のファージ10を増

殖させる。通常、上述の選別では、複数の種類のファージが選別されるため、再び、複数の種類のレクチンを発現するが、パニングの回数を重ねることにより、細胞 40 の糖鎖 50 に親和性の強いレクチンを発現するファージの数が増えることが期待される。このようにして、レクチン集合体から細胞 40 によりレクチンを選別することができる。所定の回数このようなパニングを行い、所望のレクチンライブラリを得ることができる。

【0025】

例えば、ヒト骨髄細胞から心筋細胞への分化能を有する細胞を抗体を用いて分離する方法としては、CD34 陰性かつ CD117 陽性かつ CD144 陰性かつ CD140 陽性の性質を有する細胞を分離することにより、取得することができる（国際公開番号 WO0148151：「心筋細胞への分化能を有する細胞」参照）。ここで CD34 として知られる幹細胞関連抗原はムチンとよばれる糖タンパク質のひとつである。ヒト CD34 は N 末端から細胞の外側に 260 アミノ酸からなる糖タンパク質であるが、O-結合型糖鎖が付加されるアミノ酸であるスレオニン（T）とセリン（S）が N 末端から 144 番目までに特に集中している。TTT、STS などの連続する T/S 反復配列をもち、ムチンに特徴的な構造をもつ。図 8 は、CD34 糖タンパク質を模式的に示した図である。細胞 40 の細胞膜 42 には、膜貫通タンパク質がはまり込んでおり、細胞の外側に出ている。この出た先に O-結合型糖鎖 52 や N-結合型糖鎖 54 が葉のように結合している。赤血球膜上に発現している糖タンパク質であるグリコフォリンもよく似た構造を持つ。すなわち糖タンパク質の N 末端側に O-結合型糖鎖が付加されうるスレオニン（T）とセリン（S）が集中しており、シアル酸を含む O-結合型糖鎖がクラスター状にペプチドに付加している糖タンパク質である。マウスでも同様なことが言える。このことから、心筋細胞への分化能をもつ 9-15C 細胞と骨髄細胞への分化能を有する細胞である KUSA/A1 細胞を識別するレクチンライブラリとして、「ねた」として CD34 抗原に類似した構造を有するヒト赤血球を用いて複数種類のレクチンの集合体（例えば、遺伝子改変による人工レクチン集合体）からパニングして得られたレクチンライブラリを用いることが有用と考えられる。細胞の状態は、これら糖鎖の現れ方により判別できると考えられ、こ

これらの糖鎖に特異的に結合するレクチンを特に選別するようにしたのが、本発明におけるレクチンライブラリに相当する。

【0026】

I g A 1 分子はそのヒンジ部アミノ酸配列にスレオニン (T) とセリン (S) を持っており、O-結合型糖鎖を付加した構造となっている。I g A 1 分子が持ちうる O-結合型糖鎖の構造を図 4 に示す。質量分析計などによって解析を行うと、I g A 腎症患者の I g A 1 分子に付加されている糖鎖は健常人と比較してシアル酸、ガラクトースが欠如した糖鎖不全 I g A 1 分子であることが報告されている。ここでは改変しない野生型レクチン (w t) が図 4 に示す糖鎖構造 a. を認識するイヌエンジュマメレクチン (MAH) とその遺伝子改変レクチンをレクチンライブラリとして用いることができると考えられる。遺伝子改変レクチンの集合体からヒト赤血球でパニングして回収したレクチンライブラリのうち、アミノ酸配列からユニークな特性をもつ可能性が示唆されたものを選び出すことができる。ヒト赤血球上にはグライコフォリンとよばれるシアル酸を含む O-結合型糖鎖がクラスター状にペプチドに付加している糖タンパク質が存在しており、I g A 1 ヒンジ部に近い糖鎖-ペプチド複合体としての構造をもつ。それゆえ、I g A 腎症で見られるシアル酸の欠如を識別することのできる人工レクチンを作製できる可能性が高いと考えられるからである。図 3 は、野生型イヌエンジュマメレクチン (MAH) の認識する糖鎖構造を示したものである。このように特有の糖鎖構造に対してレクチンは認識をすることができ、これらの糖鎖構造が複合したものにおいてもレクチンは有効であると考えられる。例えば、上述の I g A 1 ヒンジ部に近い糖鎖を図解した図 4 では、図 3 の糖鎖構造を a に有している。図 8 は、細胞表面に発現している糖鎖を模式的に示した図である。細胞 40 の細胞膜 42 には、長く延びるタンパク質がはまり込んでおり、細胞の外側に出ている。この出た先に O-結合型糖鎖 52 や糖鎖 54 が葉のように結合している。細胞の状態は、これら糖鎖の現れ方により判別できると考えられ、これらの糖鎖に特異的に結合するレクチンを特に選別するようにしたのが、本発明におけるレクチンライブラリに相当する。

【0027】

尚、選別には、パニング以外の種々の方法をとることができる。また、複数の種類のレクチン集合体から選別するのではなく、1又は所定の数の種類のレクチンを適宜組み合わせることにより、上述の選別と同様な機能を持つレクチンライブラリを持つことができる。例えば、遺伝子改変レクチンにおいて、所定の位置（例えば、ループD）に1のアミノ酸（1種類）を挿入することにより、1の種類の遺伝子改変レクチンを生成し、ストックしておく。同様に他の種類のアミノ酸を同じ位置に挿入することにより別の種類のレクチンのストックができる。更に、挿入する位置を変更することにより、更に多くの種類のレクチンをその種類ごとに分別してストックすることができる。これらのレクチンは、その特性が類似していると思われるが、種々の試験によりその違いも明らかにすることができる。このようにして、種類別に機能を特定したレクチンストックを適当にブレンドすることにより、同様に細胞等の識別に適切なレクチンライブラリを作成することができる。このようなレクチンライブラリは、その種類に、識別しようとする2又はそれ以上の細胞等に対して、親和性又は結合性が高い又は低いが明確に現れるものが少なくとも1つ必要であり、また、識別しようとする2又はそれ以上の細胞等に対して共に親和性又は結合性が高いものが更に含まれていることがより好ましい。また、識別しようとする2又はそれ以上の細胞等に対して共に親和性又は結合性が低いものが更に含まれていることが更に好ましい。これらと比較することにより、細胞等の識別が的確に行われることとなるからである。このようにして、必要な種類及び数のレクチンを含んだレクチンライブラリは、本発明において好適に使用され得る。

【0028】

特に、本発明におけるレクチンライブラリは、IgAグライコフォーム、転移性の異なる癌細胞、間葉系幹細胞由来の細胞集団を識別するために適用することができる。また、このレクチンライブラリを適用した解析ツールは、診断方法や診断キットに応用できると考えられる。例えば、識別を行うために選別されたレクチンライブラリをレクチン固定部に適切な順列で配列固定して識別を行うことができる。ここで、レクチン固定部は、ウェルのようなようなものであってよく、単なるスポット（外的なものによる境界が特に設けられていない場所等）であ

ってもよく、それ以外のレクチンを固定できる部分や場所であってよい。また、固体支持体は、チップであってよく、プレートであってよく、ビーズでもよく、その他の固体のものであってレクチン固定部を含むことができるものであってよい。

【0029】

選別されたレクチンライブラリは、所定のレクチンを生成する遺伝子の一部を改変することによって得られた複数のレクチンの集合体から選別されたものであることを特徴とすることができる。この所定のレクチンは、MAHレクチンであることを特徴とすることができる。また、このレクチンライブラリを固定したレクチン固定部は、糖鎖識別を行うのに適切な順列で配列された固体支持体を用いて細胞識別パターンを表示させることを特徴とすることができる。この固体支持体は、細胞表面の糖鎖に対して特異的に結合し得る異なる種類のレクチンを所定の分布で固定したことを特徴とすることができる。また、このレクチンライブラリは、少なくとも2種類の糖鎖との結合性がわかっている複数のレクチンの内、前記2種類の糖鎖との結合性の相対差が大きいレクチンのうち少なくとも1つを含むことを特徴とすることができる。更にこのようなレクチンライブラリにより糖鎖識別ツール及び方法を構成することができる。ここで、結合性の相対差は、例えば、あるレクチンと1の種類の糖鎖との結合性をAとし、もう1つの種類の糖鎖との結合性をBとした場合であって、AがBより大きい場合に、 $(A - B) / ((A + B) / 2)$ で表すことができる。結合性の相対差が大きいというのは、例えば、結合性の相対差を前記複数のレクチンの全てのレクチンに対して行った場合、相対差の全平均よりも大きいとしてもよく、また、相対差を大きい順に並べた場合に大きいものから所定の順番（例えば、1、2、3、4、等）までのものをそのように表現してもよい。ここで、糖鎖識別ツールは、糖鎖識別を行うのに適切な順列（分布）で配列された固体支持体を含んでよい。

【0030】

一般に、レクチンは、糖鎖を特異的に認識し、結合する蛋白質の総称で、上述のように大きく動物レクチンと植物レクチンに大別される。植物レクチンのなかではマメ科のレクチンが大きなレクチンファミリーを形成している。分子量3万

のサブユニットの2量体または4量体からなる。サブユニットあたり、一つの糖鎖認識部位を持つ。また、レクチンは、「酵素や抗体を除く多価の糖結合性タンパク質、もしくは糖タンパク質」と狭義に定義づけられることがあり、「糖鎖を特異的に認識して結合、架橋形成するタンパク質」とより広く定義することも可能であり、糖鎖の多くの種類を実質的に識別できる可能性を有する。特に糖鎖の多様性は、それを作った細胞の多様性に通じるものがあり、糖鎖の識別を通して細胞の識別をすることができると思う。レクチンは、抗体と異なり特定の器官や組織に限定されずほとんどすべての生物の中に見出されている。また、抗体は類似な構造を持っているのに対して、レクチンは構造的に多様である。上述の複数のレクチンには、これらのレクチンを含んでよい。本願では、このような多種多様なレクチンの一例として、マメ科のレクチンを取り上げたが、マメ科以外のレクチンを用いることができ、本願の発明の内容は、かかるマメ科のレクチンに限られるものでないことは言うまでもない。

【0031】

ここで、細胞若しくは擬細胞体（以下「細胞等」）は、所定の細胞等を含んでよく、例えば、与えられた細胞等の少なくとも一部について、細胞等自体が定義づけられた場合であってもよく、また、たとえ細胞等の構造がわからなくても細胞等を生成する方法によって細胞等が特定される場合であってもよい。また、糖蛋白質の糖修飾の程度に違い（又は異常）がある場合等もレクチンの特異な結合性に違いが生じることもあり、これも所定の細胞等に対して特異な結合性を有している例としてよい。また、例えば、ある細胞が生成する糖鎖は、その細胞を特定することにより糖鎖が特定され、ひいては、細胞の種類により糖鎖が異なることから、「ある糖鎖に対して」と読み替えても良い場合がある。更に、同一細胞であっても、その糖鎖を生成する環境により糖鎖に差異が生じるならば、同一細胞のある時期（例えば分化前段階や分化状態）を特定するものとしてよい場合もある。疾患や加齢等によって細胞表面や糖蛋白質の糖修飾の程度に違い（又は異常）があることがあるからである。特異な結合性を有するレクチンとは、全てのレクチンが同一の糖鎖に特異な結合性を有するとは限らないからである。つまり、ここで元のレクチンが特異な結合性を有するので、改変によって得られる複数

の子レクチンも同様に「特異な結合性を有する」可能性が高いと考えられる。但し、改変された複数のレクチンは、相互にその結合性が異なると考えられ、元とも結合性が異なるとも考えられる。

【0032】

レクチンは、糖結合部位に関連して糖鎖の種類を認識するが、レクチンの分子全体によるとは限ない。レクチンの所定の部分で糖鎖を認識することもあるからである。従って、糖鎖結合性の異なるレクチンを生成するレクチンの改変には、所定の部位だけを改変すればよいと考えられる。遺伝子工学的手法では、レクチンの糖結合部位に関連する部分を生成する遺伝子を特定し、遺伝子的に改変を加えた後に当該遺伝子を大腸菌のような適当なホストに移植し、改変されたレクチンを生成させる手法を含んでよい。改変は、遺伝子的にランダムに行う場合であってもよく、結果として得られるレクチンがランダムになるように、所定の遺伝子を改変する場合であってもよい。尚、ここで改変には、遺伝子の長さが変わらず各塩基の種類が変更されることだけでなく、遺伝子の長さが長くなったり、短くなったりすることを含んでよい。このことは、生成された改変レクチンにおいて同様である。このようにして得られた複数のレクチンを含むレクチンの集合体から所定の方法で選別し、レクチンライブラリを生成することができる。但し、レクチンの識別性等の効果は、実験結果から判断できる場合もあるので、改変部位を限定せず任意の部位を改変して結果的に異なる識別性を有するレクチンを複数の種類のレクチンに含むことができる。レクチンライブラリを用いて糖鎖を同定（又はある糖鎖を持つ細胞を同定）する方法とは、上述のようなレクチンライブラリから、所定の糖鎖と複数種のレクチンとの結合性（くっつきやすさ）を調べ、結合性有り（くっつく）と無し（くっつかない）の2種類又はその中間を足した3種類、或いは、より程度を増やした多段階評価（若しくはアナログ評価）で分類し、糖鎖の種類を複数種のレクチンとの結合性で識別する方法のことをいってよい。また、結合性の識別をパターンで解析することを含んでよい。結合性の判定法は種々考えられるが、例えば、標準サンプルを作っておき、それとの比較により判断することを含んでよい。

【0033】

所定の糖鎖を有する細胞若しくは擬細胞体には、所定の糖鎖が細胞表面に発現されている場合若しくはそのような擬似体を含むことができる。例えば、Aという細胞についてレクチンライブラリを作成する場合は、通常A若しくはA擬似体が含まれる。また、糖鎖解析とは、糖鎖を有する細胞の同定、血清蛋白質の糖修飾（グリコフォーム）の診断、疾病診断、その他の解析を含み、糖鎖解析方法は、これらのことを行う方法を含む。所定の糖鎖を有する細胞若しくは擬細胞体又は所定の細胞若しくは擬細胞体を使用してパニング又はそれ以外の方法で選別した複数種類のレクチンにより構成されるレクチンライブラリを用いた疾病診断用ツールは、疾病（又は健康）状態により細胞の糖鎖の構造（又は状態）や糖蛋白質の糖修飾等に違いが現れる場合であって、このような違いに対して該レクチンライブラリとの結合性の違いの対応がとれている場合に、該糖鎖等と該レクチンライブラリとの結合性の変化を調べることができ、疾病（又は健康）状態を判別することができるツール（診断薬、診断装置、等）を含んでよい。このとき、糖鎖の構造（又は状態）を認定することは、必ずしも必要としない。糖鎖識別を行うために選別されたレクチンを含むレクチン固定部が、糖鎖識別を行うのに適切な順列で配列されることは、細胞識別を行うために選別されたレクチンを含むレクチン固定部（ウェル又はスポットを含んでよい）が、細胞識別を行うのに適切な順列で配列されることを含んでよく、視覚的にパターンを認識しやすくなるように、予め決められた位置に選別されたレクチンを含むウェル（well）又はスポットを配列することを含んでよい。このとき、流路系でもかまわない。標準パターンを作成した場合は、その標準パターンに準じた位置に上記ウェル又はスポットを配列することを含む。ここで、「表示させる」は、直接・間接のいずれであってもよい。また、レクチン固定部からなるチップを用い視覚的にいうなれば、パターン情報に該当する情報を得、それを基に細胞同定をすることができる。但し、視覚的にいうなればパターン情報であっても、その数が膨大である場合は、肉眼その他の方法での目視では不十分なことが多く、コンピュータを用いて、クラスター解析等により、細胞同定を行ってもよい。クラスター解析では、どの部分に比較したいもの（例えば、標準と検討対象物、又は、コントロールと比較物）の違いが大きく出ているかをコンピュータを利用して調べることであ

ってよく、一般のクラスター解析ソフトを用いることもできる。

【0034】

また、レクチンライブラリの個々のレクチンを所定の分布で固定した糖鎖解析用固体支持体においては、異なる種類の個々のレクチンを固定する位置が目的の細胞若しくは疾病診断により決めることができる。従って、異なる細胞若しくは疾病診断を対象とする時は、これらの所定の分布は異なっていてよい。同様に、上記チップでは、目的の細胞若しくは疾病診断により適切な配列が種々存在していてもよく、逆に、目的の細胞若しくは疾病診断に合わせて配列を最適化することがより好ましい。固体支持体は、チップであってもよく、プレート、ビーズ、センサーチップであってもよく、その他の固体のものであってレクチン固定部を含むことができるものであってよい。即ち、「糖鎖解析用固体支持体」は、「糖鎖解析用試験プレート」を含んでよい。「糖鎖解析用試験プレート」は、ろ紙のような紙を使った試験紙を含み、ガラス板やその他の材質の基材の上に所定のレクチンを固定したものも含んでよい。ここで、その他の材質の基材は、合成樹脂（プラスチックを含む）、金属（白金、銀、銅、金、シリコン等を含む）、雲母、及び、これらの混合物を含んでよい。このような「糖鎖解析用試験プレート」は、診断薬としても用いることが可能である。

【0035】

診断キットにおいて、検出を検体そのものの染色または標識した蛍光を検出してもよく、分子間相互作用の質量変化を検出してもよく、電流として検出してもよい。分子間相互作用の質量変化は水晶発振子天秤でも表面プラズモン共鳴法であってもよい。又は、糖蛋白質の糖鎖をレクチンライブラリで解析したのち、2次抗体によって糖蛋白質の蛋白を蛍光標識してもよく、または糖蛋白質の蛋白をパルスレーザの照射によってイオン化した蛋白質を質量分析計によって検出してもよい。更に、これらを組み合わせてもよい。

【0036】

例えば、本発明におけるレクチンライブラリの個々の種類のレクチンを所定の位置に固定して、異なる種類のレクチンを含むレクチン固定部を作り、その上に、検体となる、例えば、血清を流してレクチンに接触させ、そのレクチンの種類

に応じた血清糖蛋白の糖鎖に対する親和性で結合させ、結合しない若しくは結合力が特に弱い血清糖蛋白を洗い流した後に、結合して固定された血清糖蛋白の糖以外の構造に結合性（識別しようとする血清蛋白の微妙な差異を区別できる結合性を持たない程度の結合性でよい）のマーカーを結合させ、余分なマーカーを洗い流した後に、発色等によりマーカー判読できるようにして、血清の識別を行うことができる。また、血清糖蛋白の糖鎖以外の構造に結合性を有する抗体を固定しておき、その上に、検体となる、たとえば血清を流して抗体に接触させ、抗体の種類に応じた血清糖蛋白の糖鎖以外の構造に対しての親和性で結合させ、結合しない若しくは結合力が特に弱い血清糖蛋白を洗い流した後に、結合して固定された血清糖蛋白の糖鎖構造を識別するために種々のレクチンを結合させ（識別しようとする血清蛋白の微妙な差異を区別できる結合性を持たない程度の結合性でよい）、余分なレクチンを洗い流した後に、発色等により判読できるようにして、血清の識別を行うことができる。

【0037】

逆に、検体を固定した場合は、レクチンライブラリを含む識別剤をその上に流し、各レクチン固有のマーカー（例えば、タグを遺伝子工学的につけて、そのタグの発色等、又は、タグ特有の結合性マーカーを用いる）により、結合したレクチンの種類を特定し、検体の識別や診断を行うことができる。

【0038】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を具体的な例を上げ、図を参照しつつ、より詳しく説明するが、1つの具体的な例として材料等が挙げられているに過ぎず、本発明はこれらの実施例に限られるものではない。

【0039】

シアル酸を含む糖鎖に特異的なマメ科レクチンである *Maackia amurensis* he magglutinin (MAH) の糖結合部位に関連すると思われる部分の少なくとも一部を遺伝子工学的手法でランダムに改変し、ランダムに改変したレクチンから複数の種類の異なる糖鎖のバリエーションを見分けられる複数の人工のレクチンを作製した。また、得られた人工レクチンの集合体を利用して、所定の細胞等を使

用して種類の異なる細胞への結合パターンから細胞の種類の違いを見分けることができるレクチンを選別し、1つのレクチンライブラリを作成した。そして、このレクチンライブラリにより、生物学的に重要な糖鎖に特異的なレクチンを選別するための、スクリーニング系を確立することができた。ここで、哺乳類の細胞には、わずかな構造上の差異を有する多様な複合糖質が存在していることが知られている。また、このように多様な構造を識別できるレクチンを生成することは非常に有用であると考えられる。MAHは、相対分子量 (relative molecular mass) 29,000であり、サブユニットのダイマーからなる。MAHにエンコードされたcDNAのヌクレオチド配列及びそれから導き出されたアミノ酸配列では、MAHは287のアミノ酸からなり、30のアミノ酸シングルペプチドを含んでいることを示している。推定されているMAHの糖鎖認識ドメインは、そのアミノ酸シーケンスを他のマメ科植物 (legume) のレクチン (7) のアミノ酸シーケンスと比較すること、及び、MAHにその結合特性を賦与するこれらのアミノ酸により定義されるこのドメインの遺伝的変異の古くからの研究により同定されている。また、Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3 (Neu5Ac α 2-6) GalNAc (8) を含むMAHの3次元構造のコンピューターモデルから、これらの観察が確認された。

【0040】

【実施例】

<実施例1>

[ループC改変レクチンの赤血球パニング法によるレクチンライブラリの取得]

MAHレクチンのループCにおけるランダムな改変を行った。MAHのループCの糖鎖認識部位に相当するアミノ酸配列のうち、糖鎖の認識およびレクチンの構造保持のために必要と考えられるAsp127、His32、Asp135は保存して変異を加えなかった。

【0041】

[ループC改変MAHの作製]

MAHレクチンはファージ上に発現し、赤血球を凝集することを確認したのちにMAHのループC糖鎖認識部位は、AmpliTaq Gold DNAポリメラーゼ (AmpliTaq Gold DNA polymerase (PE Biosystems社製)) によって、パーキン・エルマー

2400熱サイクル装置 (Perkin-Elmer 2400 thermal cycler) でランダムに改変された。このとき用いたプライマー及びリバース・プライマー (reverse primer) を表1に示す。

【0042】

【表1】

プライマー等

プライマー: *Eco*RI サイトを含む

5'-CCGGAATTCGACACTTACNNKN¹NCATNNKNNKGATNNKNNKGACCCA
AACTACAGACATATC -3'

リバースプライマー; *Bam*HI サイトを含む

5'-CACAAACGAATGGGGATCCAC -3'

【0043】

PCR生成物を得るために次のようなプロトコールが用いられた。まず、95℃で9分間、(94℃で1分間、54℃で1分間、72℃1分間)のサイクルを30回である。生成物は、過剰量の制限酵素 *Eco*RI 及び *Bam*HIによって処理した。生成物は、制限酵素*Eco*RI/ *Bam*HI処理野生型MAH-pComb3 (*Eco*RI/ *Bam*HI -digested w.t.MAH-pComb3ファージミド (pComb3 phagemid vector having w.t.MAH cDNA)) にライゲートされた。

【0044】

[ファージの準備]

MAHレクチン-pComb3は、大腸菌 (*E.coli*) SURE 2細胞 (Stratagene社製, La Jolla, CA) に組み込まれた。この細胞を50 µg/ml カルベニシリン (carbenicillin) を含むHEM プレート (24 g/L tryptone, 48 g/L yeast extract, 10 g/L MOPS, pH7.0) 上で、37℃で8時間培養した。細胞は、プレートを10ml HEM に浸して、はがし、回収した。細胞を含むHEM培地を、100 ml HEM (pH 6.9, supplemented with 1mM CaCl₂ and 1mM MnCl₂) /carbenicillin) 1-2時間培養した。A600を約0.3になるように調製し、培養細胞をVSCM13 helper phage (約10¹² pfu; Stratagene社製, La Jolla, CA)に感染させた。感染したファージは、30℃で12時間振盪して培養し、ポリエチレン・グリコール8000及

びと NaCl 沈殿によって一晩かけ 4℃で、培養物から単離した。遠心分離した後、ファージ・ペレットは、トリス緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline (TBS: 50mM Tris-HCl, pH 7.5 containing 150mM NaCl)+1% bovine serum albumin (BSA)) に懸濁した。

【0045】

[ヒト赤血球細胞によるパニング]

パニングには、ヒト赤血球細胞を用いた。各パニングにおいて、約 10^{12} pfu のファージを、1% BSA を含む $6.00 \mu\text{l}$ の TBS に $5 \mu\text{l}$ のヒト赤血球細胞を懸濁した液に加え、4℃で5時間の回転式培養した。細胞をペレットとして回収し、1ml の TBS で 4℃で2回洗浄した。ファージを含む最終細胞ペレットに、2ml の ($\text{OD } 600 = 1$) Sure cells を加えて培養した。37℃で15分間培養した後、大腸菌細胞を、multiple HEM (pH 7.0)/carbenicillin plates 上に移し、37℃で8時間培養した。大腸菌細胞培養上澄みからファージ懸濁液を調製し、この操作を3回繰り返した。

【0046】

[改変レクチンの DNA 配列決定とフラグ・ペプチド導入]

1 回目のパニングにより得られたクローンは 2.74×10^7 個、3 回目のパニングののちに得られたクローンは 1×10^9 であった。ランダムに選んだ 28 クローンのアミノ酸配列を決定したところ、そのうちの 10 クローンが野生型 MAH と異なるアミノ酸配列を持っていた。各改変 MAH cDNA-pComb3 は、センス・プライマー (sense primer) N-Flag-XhoI: 5'-CCAGGTGAACTGCTCGAGTCAGATG-3' を用い、また、アンチセンス・プライマー (antisense primer) N-Flag-BglII: 5'-TCCACCGCCAGATCTCTATGCAGTGTAACG-3' を用いて、PCR された。得られた PCR 生成物は、PCR 回収キット (PCR purification Kit (QIAGEN 社製)) を用いて回収し、制限酵素 XhoI 及び BglII によって処理した。処理されたものは、XhoI/BglII 消化した pFlag-ATS (Sigma 社製) にライゲートした。得られた各プラスミドは、大腸菌 (E. coli) JM109 に組み込んだ。

【0047】

[フラグ融合プロテインの発現]

既知の発現プラスミドを含む大腸菌 (E.Coli) JM109を、37℃で3時間、1mM CaCl₂, MnCl₂, 20mM MgCl₂を含むHEM培地において培養した。isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG:final concentration 1mM) を加えてフラグ融合プロテインの発現を誘起したのち、さらに37℃で3時間培養した。培養した大腸菌を、9600rpmで遠心分離してペレットとし、TBS (Tris Buffered Saline) に懸濁した。この懸濁液を液体窒素と37℃のウォーターバスを用いて、凍結と解凍を5回繰り返した。得られた懸濁液は、4℃、30分間15000rpmで遠心分離した。フラグ融合プロテインが含まれている上澄みを取り、BCAプロテイン・アッセイ・キット (BCA protein assay kit (PIERCE社製)) によって蛋白質成分を定量した。

【0048】

ここで、パニングとは、ファージ上に発現した蛋白質を、その蛋白質が結合する物質 (例えば抗原と抗体、レクチンと糖鎖、レセプターとリガント、等) との結合能を利用してファージを回収する手法のことをいい、例えば、ファージに発現させた蛋白質との結合する相手物質をプレートに固定し、ファージ溶液を加えて、発現した蛋白質、ファージ、その他の物質を結合させ、前記ファージ溶液を流し出した後に、結合した発現した蛋白質、ファージ、その他の物質を回収する方法である。この回収したファージを大腸菌に感染させて増幅し、再びパニング (上述) を行って結合性の高いファージを回収していくことができる。

【0049】

<実施例2>

[IgAグライコフォームの識別]

上述のレクチンライブラリをIgAグライコフォーム識別法に適用する場合の1例を以下に順序をおって説明する。(1) MAHレクチン (イヌエンジュマメレクチン) 糖認識部位のアミノ酸配列を改変した遺伝子改変レクチンライブラリを作成する。(2) IgA腎症患者IgAに親和性の高いレクチンをパニング法により選択し、レクチンサブライブラリを作製する。(3) 上記の(2)で得られたレクチンサブライブラリの中から必要に応じIgA腎症患者と健常人のIgAの違いをよく反映するレクチンを選び、マイクロタイタープレートに固

定したレクチンプレートを作製する。(4) IgAのグライコフォームのレクチンライブラリーによる識別IgA腎症患者と健常人の血清IgAのレクチンプレートへの結合パターンの比較・解析を行う。(5) 血清診断アッセイ条件の検討市販健常人IgAに糖鎖を酵素的・化学的に付加し、人工IgAを作製する。健常人血清に人工IgAを混合し、レクチンプレートを用いたパターン解析を行う。血清中に存在する他の血清蛋白質の影響を検討し、アッセイ条件の最適化を行う。

【0050】

ここで、IgA腎症とは腎臓糸球体にIgAが沈着する疾患であるが、IgA分子のヒンジ部の糖鎖構造が患者と健常人で異なり、その糖鎖構造の解析には従来血清IgAを精製、トリプシン処理によってヒンジ部を含むペプチド片にして分離し、その質量を質量分析計で測定することにより構造解析が行われている。ここで、ヒンジ部とは、免疫グロブリン分子を構成する2つのH鎖定常ドメインの間にある領域のことをいい、IgA腎症患者ではIgAのこの領域のO（オウ）-結合型糖鎖に異常が起きるとされている（図4）。また、O（オウ）-結合型糖鎖とは、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）、ガラクトース（Gal）および最外側のシアル酸から構成された構造を基本骨格とするO（オウ）-結合型糖鎖はムチン型糖鎖ともいわれ、細胞の浸潤、接着など細胞間の相互作用や挙動に大きく影響する糖鎖構造である。

【0051】

本方法のメカニズムをより詳しく説明すれば、IgA腎症患者でO（オウ）-結合型糖鎖の糖鎖異常が見られるIgAヒンジ部分のアミノ酸配列のうち、O（オウ）-結合型糖鎖を付加できるのはセリンまたはスレオニン残基のある5箇所であり、O（オウ）-結合型糖鎖のパターンは6種類あるので、ヒンジ部分O（オウ）-結合型糖鎖の位置と糖鎖構造は理論上 6^5 通り、つまり7,776通りあることになる。ひとつひとつの可能性を従来から行われている煩雑な糖鎖解析によって調べることは困難であるが、O（オウ）-結合型糖鎖を認識するレクチンへのON/OFFによってパターン解析を行うことができると考える。ひとつのレクチンに対するON/OFFでは2通りの糖鎖結合様式を調べることができ、

n 個のレクチンでは 2^n 通りのパターン認識が行えるはずである。したがって、計算上はヒンジ部分の糖鎖異常 7, 776 通りを解析するために必要なレクチン数は 13 個である。実際には糖鎖構造および糖鎖の位置情報を顕著に示すことのできるレクチンがあつての理論上の数字ではあるが、基質にプロットできる数百個のレクチンからの情報で IgA ヒンジ部分の糖鎖構造と位置を解析できる可能性が高い。有用なレクチンライブラリーを得るために、患者血清 IgA と健常人血清 IgA の違いをもっとも大きく反映するレクチン群をクラスター解析によって取得することができ、有効なレクチンライブラリーを構築することができる。そのレクチンライブラリーを用いて、IgA 腎症患者と健常人血清 IgA のグライコフォームの違いをパターンにより解析する (図 11)。この図において、試験管 62 に入った血清 IgA を含む液 62 をピペット 64 で取り、レクチンチップ 70 の上に固定させているレクチンライブラリーの各種レクチン 72 の上に滴下し、洗浄後抗 IgA により発色させ、発色したスポット 74 としないスポット 72 により 1 つのパターンを作ることができる。これを表 80 にまとめれば、検査結果が定性及び定量的に判断でき得る。この図では、複数の O-グリカンを含む糖蛋白質である IgA1 のプロファイリングを簡単に行うようすが示してある。慢性腎不全状態になっているような重症患者との違いのほか、IgA 腎症と診断されていない軽症患者予備軍の早期診断への応用可能性もある。

【0052】

以上のことを確認するために、以下の実験を表 2 に示す材料で行った。

【0053】

【表 2】

実験に用いた材料

- Human-IgA1, Plasma (CALBIOCHEM #400105) TBS(pH7.5)で 5 μ g/ml に希釈
- シアル酸切断処理 Human-IgA1, Plasma (CALBIOCHEM #400105) TBS(pH7.5)で 5 μ g/ml に希釈
- 人工レクチン及び野生型レクチンを含むライセート(1 mg/ml)
- レクチンを含まない pFLAG-ATS のライセート(1 mg/ml) コントロール用
- mouse anti-FLAG M2 monoclonal 抗体 (SIGMA #F-3165) 原液を 1%BSA/TBST で 1000 倍に希釈
- HRP-goat anti-mouse IgG (H+L) 抗体 (Zymed #62-6520) 原液を 1%BSA/TBST で 1000 倍に希釈
- ABTS/H₂O₂ ABTS 0.274 g、Citric acid 10.5 g を Milli-Q 500 ml に溶かし、NaOH で pH 4.2 に合わせ、使用直前に H₂O₂ を 1/1000 量加える。
- 96 well-ELISA plate (SUMILON #MS-8996F)

【0054】

96 well-ELISA プレートに Human-IgA1 を 50 μ l (0.25 μ g/well) ずつ入れ、4℃で一晩静置して抗体をウェルに固定した。ウェルを TBS で 3 回洗い、3%BSA/TBS 200 μ l を加え、室温でブロッキングした。3 時間後、ウェルを TBS で 3 回洗い、各ウェルに人工レクチンを含むライセートを 50 μ l (μ g/well) ずつ入れた。ここで用いたレクチンライブラリのペプチド配列を図 9 に示す。ここでは、N 末から数えた 127 番目のアミノ酸のから 137 番目のアミノ酸の配列が記載されているが、残りは天然の MAH レクチンのアミノ酸配列と同じである。図からわかるように、このレクチンライブラリには、クローン 1 から 10 までの種類のレクチンが含まれていた。室温で 2 時間おいてライセート中のレクチンを結合させたのち、ウェルを TBST (0.1%Tween/TBS) で 3 回洗い、mouse anti-FLAG M2 monoclonal 抗体 (SIGMA #F-3165) を 50 μ l ずつ入れた。室温で 30 分反応させてから、ウェルを TBST で 3 回洗い、HRP-goat anti-mouse IgG (H+L) 抗体 (Zymed #62-6520) を 50 μ l ずつ入れた。室温で 30 分反応させたのち、ウェルを TBST で 3 回洗い、各ウェル ABTS/H₂O₂

2を50 μ lずつ加えて発色させ、プレートリーダーで吸光度(405、490 nm)を測定した。IgA1および糖鎖が切断されたIgA1について、各人工レクチンへの結合が測定され、以下のような結果が出た(図10、12)。このことから、レクチンライブラリがIgAグリコフォームの検出に有用であることが確認された。

【0055】

IgA1のシアル酸切断処理は以下表3に示す材料で以下のように行った。

【0056】

【表3】

シアル酸切断処理に用いた材料

- ・Human-IgA1, Plasma (CALBIOCHEM #400105) 1mg/ml
- ・ノイラミニダーゼ(Nakalai Tesque #24229-61) 2.0 unit/ml
- ・酢酸ナトリウム緩衝液[0.2M 酢酸ナトリウム(pH5.5)、0.4M NaCl]

Human-IgA1に等量の酢酸ナトリウム緩衝液を加え、溶液のpHを、ノイラミニダーゼを0.5 \cdot l(1 unit)加える。37℃の水浴で一晩反応させ、IgA1のシアル酸を切断する。TBSを加え、溶液のpHを中性に戻す。シアル酸切断確認はビオチン標識精製PNA(ピーナッツレクチン)(生化学工業 #300430)およびMAL II(イヌエンジュレクチン)(VECTOR #B-1625)への結合によって確認された。

【0057】

<実施例3>

[間葉系幹細胞由来骨芽細胞亜集団の識別方法]

上述のレクチンライブラリを骨芽細胞の識別や分化ステージの異なる亜集団を検出する方法に適用する場合の1例を以下に順序をおって説明する。

【0058】

(1) MAHレクチン(イヌエンジュマメレクチン)糖認識部位のアミノ酸配列を改変した遺伝子改変レクチン集合体を作成する。(2)レクチンライブラリーの作製骨芽細胞に親和性の高いレクチンをパニング法により選択し、レクチンライブラリーを作製する。(3)上記の(2)で得られたレクチンライブラリーの中から必要に応じ分化のステージをよく反映するレクチンを選び、マイクロタ

イタープレートに固定化したレクチンプレートを作製する。(4) 骨芽細胞の分化誘導とレクチンライブラリーによる識別培養した間葉系幹細胞を培養・分離する。より具体的には、間葉系幹細胞を培養後、骨芽細胞に分化させ、分化開始から5日目、10日目、15日目、20日目の細胞を分離する。(5) 分化過程の各時点で分離した細胞をレクチンプレートにて分析し、細胞表面糖鎖構造と骨形成能との相関を検討する。骨形性能の測定には骨型アルカリフォスファターゼ活性の測定およびオステオカルシン含有量の測定を行う(標準の作成)。即ち、分離した細胞を骨芽細胞を足場となる β -TCPブロックとの複合体の形でラット背部皮下に移植し、移植後4週、8週において摘出後、(i) オステオカルシン含有量と(ii) 骨型アルカリフォスファターゼ活性を測定する。(6) 分化過程が不明の細胞をレクチンプレートで分析し、標準と比較する(図13)。

【0059】

ここで、間葉系幹細胞とは、組織や臓器に成長する元となる細胞である幹細胞のうち、骨髄の中に存在するものをいい、間葉系幹細胞は骨、軟骨、脂肪、心臓、神経、肝臓などの細胞に分化することが確認されており、ほとんどすべての組織にも分化することのできる胚性幹細胞(ES細胞)に近い能力を秘めている。

【0060】

以下のような例を示すことができる。表4に示す材料を用いて、C3H/Heマウス骨髄細胞から分化誘導を行うことによって得られた細胞のうち、心筋細胞への分化能をもつ9-15C細胞(Makino et al, The Journal of Clinical Investigation, March 1999, Volume 103, No5)と骨芽細胞への分化能をもつKUS A/A1細胞(Kohyama et al, Differentiation, 2001, 68:235-244)に対するレクチンライブラリーの結合活性をReverse Cell ELISA法により測定した。

【0061】

【表 4】

実験に用いた材料

- ・人工レクチン及び野生型レクチンを含むライセート(1 mg/ml)
- ・レクチンを含まない pFLAG-ATS のライセート(1 mg/ml) コントロール用
- ・細胞 (KUSA/A1・9-15C) 1%BSA/PBS で 7.5×10^5 cells/ml に調整
(細胞は慶応義塾大学医学部病理学教室・梅澤博士より)
- ・mouse anti-FLAG M2 monoclonal 抗体 (SIGMA #F-3165) TBS(pH7.5)で 5 g/ml に希釈
- ・0.1%クリスタルバイオレット(25%メタノール)
- ・96 well-ELISA plate (SUMILON #MS-8996F)

【 0 0 6 2 】

Reverse Cell ELISA法は以下のように行った。96 well-ELISA プレートに抗FLAG抗体を $50 \mu\text{l}$ ($0.25 \mu\text{g/well}$) ずつ入れ、 4°C で一晩静置して抗体をウェルに固定した。ウェルをTBSで3回洗い、3%BSA/TBS $200 \mu\text{l}$ を加え、室温で3時間ブロッキングした。ウェルをTBSで3回洗い、各人工レクチンを含むライセートを $50 \mu\text{l}$ ($50 \mu\text{g/well}$) ずつ入れ、室温で2時間おいてライセート中のレクチンを結合させた。ウェルをTBST (0.1% Tween/TBS) で3回洗い、各ウェルに細胞浮遊液を $100 \mu\text{l}$ (7.5×10^4 cells/well) 加えた。 1000 rpm で5分、室温でプレート遠心し、細胞をウェルの底へ沈める。室温で2時間静置し、細胞とレクチンを結合させる。ウェルをPBSで2, 3回洗う。バッファーが細胞に直接当たらないようにする。ウェルに 0.25% グルタルアルデヒド/PBSを $100 \mu\text{l}$ 加え、レクチンに結合した細胞を30分間固定する。ウェルをTBSで3回洗い、 0.2% クリスタルバイオレット (25% メタノール) を適量 (細胞が浸る程度) 加えたのち、5~10分室温で放置し、細胞を染色する。プレートを水洗いし、ウェルを風乾してからアッセイ用アルコール (10% メタノール、 40% エタノール、 50% 水) を $200 \mu\text{l}$ 加える。 37°C で10分インキュベートしたのちにプレートリーダーで吸光度 (550 nm) を測定した。結果は図14に示す。改変を行っていないワイルドタイプ (wt) との相

対値を示した。このことから、レクチンライブラリが間葉系幹細胞由来の細胞亜集団の分別同定に有用であることがわかった。

【0063】

<実施例4>

c o l o n 3 8細胞はC57BL/6マウスに*in vivo*で化学発がんによって作られ、マウス個体で継代されて確立された癌細胞株である (Corbett et al, Cancer Res35, 2434-2439, 1975)。c o l o n 3 8細胞をマウス脾臓に注射したのちに肝転移をおこした細胞を*in vitro*で培養という*in vivo*と*in vitro*のサイクルを4回繰り返すことにより、同所移植の系でも高頻度の肝転移形成が見られる非常に転移性の高い細胞株SL4が得られた (Morimoto et al, to be published)。転移性能の異なる2つの細胞株と人工レクチンとの結合性を解析した。以下に方法を示す。

【0064】

[ループDにおける延長]

癌細胞の転移性を判別するために以下の手順でレクチンライブラリを準備した。MAHのループDの中央部6箇所(アミノ酸配列219~224の前)に1アミノ酸を挿入することにより、糖鎖認識特異性の異なる多様なレクチンを含むライブラリを作製した。ベクターにN末にFLAGタグを付加するpFLAG-ATSを用いたが、マルチクロニングサイトにはMAHを組み込むのに都合の良い制限酵素部位が無かったので、Site-Directed Mutagenesisのプロトコールに従い、Bgl II site をSpe I site に作り変えた。まず、改変したい部位を含むプライマーをsense側、anti側でまったく相補的になるように設計した。次にPCRを行い、Dpn I 1 μ lを加え、37℃で1時間インキュベートした。このDNA溶液をそのまま用いてXL1-Blueにトランスフォーメーションした。再度に、得られたコロニーをショートカルチャーしてプラスミドを回収し、BigDye Terminator Cycle Sequencing によりそのDNA配列を読んで、改pFLAG-ATSを同定した。(表5参照)

【0065】

【表 5】

ベクターの作成

PCR 反応液の組成 (template (pFLAG-ATS) 1 μ l, primer(pFLAG-Spe I -sense 100 ng/ μ l, pFLAG-Spe I-anti 100 ng/ μ l) 各 1.25 μ l, 10XPCR buffer 5 μ l, dNTP 1 μ l, MilliQ 40.5 μ l, pfu turbo 1 μ l)

PCR の反応条件 (95°C 30sec, 12 サイクル [95°C 30sec, 55°C 1 min, 68°C 10 min])

プライマーの配列

pFLAG-Spe I-sense: 5'-ccgggtacctgcactagtagatagatgagctc

FLAG-Spe I-anti: 5'-gagctcatctatctactagtagcaggtacccgg

【0066】

[ベクターの移しかえ]

野生型MAH cDNAとMAH由来の人工のcDNAをpFLAG-CTSからPCRで増幅して制限消化 (Xho I conc. と Spe I conc. (ロッシェ社製)) し、改pFLAG-ATSに組み込んだ。これをJM109にトランスフォーメーションし、得られたクローンをBigDye Terminator Cycle Sequencingにより同定した。(表6参照)

【0067】

【表 6】

ベクターの移しかえ

PCR 反応液の組成 (template 1.5 μ l、primer(N-Flag-XhoI 100 ng/ μ l、MAH-SpeI-anti 100 ng/ μ l) 各 0.5 μ l、dNTP 4 μ l、10XPCR buffer 5 μ l、TaqGold 1 μ l、MilliQ 38.5 μ l)

PCR の反応条件は一般的なもの (96°C 5 min、30 サイクル [96°C 1 min、55°C 1 min、72°C 2 min]、72°C 5min)

プライマーの配列

pFLAG-XhoI : 5'-ccaggtgaaactgctcgagtcagatg

MAH-Spe I-anti: 5'-tgggcaactagttgcagtgtaacgtgcg

シーケンスに用いたプライマーの配列

N-26 : 5'-catcataacggttcttgcaaatattc

LoopD-Seq: 5'-gttaatagcatctctagtttacc

【0068】

[ループDの伸張]

制限酵素として (Xho I .conc 及び Bgl II.conc) を用いて上記と同様にクローンを作成し、単離・同定した。ランダムにアミノ酸を挿入するプライマーを用いた改変では、単離できなかったクローンについては、個別にプライマーを設計して同じように単離・同定した。(表7参照)

【0069】

[改変MAH cDNAを持つクローンの単離・同定]

マルチクローニングサイトのBgl II site をSpe I site に変換することができた。目的の部分以外には変異は存在しなかった。理論上予測される120種類の改変MAHを単離・同定することができた。

【0070】

【表 7】

ランダムに改変する時に用いたプライマー

N-Flag-XhoI: 5'-ccaggtgaaactgctcgagtcagatg

LLD3: 5'-ctacaagatctaacatcggtgggtttcaactgcmnntttaggagcacccgtggcagcaga

LLD4: 5'-ctacaagatctaacatcggtgggtttcaactgctttmnnaggagcacccgtggcagcaga

LLD5: 5'-ctacaagatctaacatcggtgggtttcaactgctttaggmnnagcacccgtggcagcaga

LLD6: 5'-ctacaagatctaacatcggtgggtttcaactgctttaggagcmnnaccgtggcagcaga

個別に設計したプライマー

MAHloopD-1Phe:

5'-ctacaagatctaacatcggtgggtttcaaaaactgctttaggagcacccgtggcagcaga

MAHloopD-2Asp:

5'-ctacaagatctaacatcggtgggtttcaacatctgctttaggagcacccgtggcagcaga

MAHloopD-3Cys:

5'-ctacaagatctaacatcggtgggtttcaactgcacatttaggagcacccgtggcagcaga

MAHloopD-4Asp:

5'-ctacaagatctaacatcggtgggtttcaactgctttatcaggagcacccgtggcagcaga

MAHloopD-6Phe:

5'-ctacaagatctaacatcggtgggtttcaactgctttaggagcaaaacccgtggcagcaga

【0071】

[BigDye Termination Cycle Sequencing プロトコールの変更]

今回のシーケンスでは、既知のプロトコールを変更して行っているので、その変更点を箇条書きにして表 8 に示す。

【0072】

【表 8】

プロトコールの変更点

PCR 応液の組成:

5X Sequencing Buffer 2 μ l \rightarrow 10X PCR Buffer 2 μ l

エタノール沈殿より調整後のシーケンスサンプルを溶かす溶媒

Hi-Di Formamide 20 μ l \rightarrow MilliQ 20 μ l

【0073】

[大腸菌溶解物 (ライセートの作製)]

カルベニシリンを入れたHEM (Highly Enriched Medium) で単離してある大腸菌を一晩短期培養 (small-culture (over night)) した。翌日、HEM 20 ml, CaCl₂ (1M) 20 μ l, MnCl₂ (1M) 20 μ l, MgCl₂ (4.9M) 81.7 μ l からなる培地に短期培養 (small-culture) した大腸菌を200 μ l加えて、3時間予備的培養 (pre-culture) した。ここへ、100 mM IPTGを200 μ l加えて、3時間培養し誘導をかけた。次に9,500 rpmで10分間遠心して大腸菌を回収し、TBS 200 μ lに懸濁して-80℃に保存した。後日、大腸菌を凍結 (液体窒素) と融解 (37℃湯浴) を5回繰り返して、15,000 rpmで20分間遠心して上清をライセートとして回収した。このライセートは、タンパク定量を行った後に-80℃に保存し、これを使用する準備が整ってからタンパク濃度1 mg/mlに希釈して4℃保存した。

【0074】

[SDS-PAGE及びウェスタン・ブロッティングによるフラグ融合プロテインの検出]

ライセート中に改変FLAG-MAHが存在しているのか調べるために、適当にサンプルを選んでSDS-PAGE、及び、ウェスタン・ブロットを行った。抗体染色では、1次抗体として、anti-MAH rabbit polyclonal 抗体、又は、anti-FLAG M2 monoclonal 抗体を用い、2次抗体にはそれぞれAP-goat anti-rabbit IgG 抗体と、AP-goat anti-mouse IgG 抗体を用いてABCキットで発色させた。フラグ改変レクチンは、フラグ融合タンパクとしてもMAHとしても発現が確認できた。

【0075】

[2種のがん細胞の識別]

96 well-ELISA 用プレートに poly-L-lysine (1 μ g/well) をひき (37℃で30分間インキュベート)、細胞溶液 (105 cells/well; Collon-38, SL-4, Caco-2, 分化型 Caco-2) を加え、グルタルアルデヒド (glutaraldehyde (25%)) (1 μ g/well) によりこれをプレートへ固定 (室温で30分間静置) した。細胞

を固定したプレートはTBSを入れて4℃保存し、更に、3%BSA/TBSでブロッキング（室温で3時間振盪）して、上で作製した改変MAHレクチンを含むライセート（50 μ g/well）を加えた（室温で2時間振盪）。1次抗体には、anti-FLAG M2 monoclonal抗体（1000倍希釈を50 μ l/well）、2次抗体には、HRP-goat anti-mouse IgG 抗体（1000倍希釈を50 μ l/well）を用いた（共に室温で30分間振盪）。ABTS/H₂O₂（50 μ l/well）で発色させ、OD_{405/490}を測定した。

【0076】

図16は、120種類の改変レクチンとColon-38又はSL-4との結合性を示す。ここで、Colon38、SL4は同じ起源であるが、転移性の異なる2つの癌細胞セルラインである。図中、1Qとは、図15において、1の位置にグルタミンが入ることを意味し、2Cとは、2の位置にシステイン（Cysteine）が入ることを意味し、3Dとは、3の位置にアスパラギン酸（Aspartic acid）が入ることを意味し、3Sとは、3の位置にセリン（Serine）が入ることを意味し、4Nとは、4の位置にアスパラギン（Asparagine）が入ることを意味する。即ち、一般には、“nX”とは、図5の“n”の位置に“X”というアミノ酸が挿入されたことを意味する。上述のように性質の異なる細胞との結合性が異なるのは、細胞表面の糖鎖の違いによるものと考えられ、従って、これらのレクチン群を用いれば、糖鎖若しくは細胞の特徴を判別できることになる。従って、最初に既知の糖鎖により、これらの改変レクチン群を分類し、それぞれの類を解析するための改変したレクチンの種類を選択しておけば、既知の糖鎖に基づいた糖鎖マッピングにおける未知の糖鎖の位置が判明すると考えられる。特に、Colon38とSL-4のように起源が同じ細胞等においても、それぞれ結合性が異なるレクチンが存在し、その差異を明確にできると考えられる。このように、120種の改変レクチンを全て使って糖鎖解析をすることは、類似する糖鎖認識機能を有しながら、少しずつ異なると考えられるこれらのレクチンの集合により、多面的に未知の糖鎖を解析することができるだけでなく、この中から、さらに、別の切り口（例えば、挿入箇所を固定し、アミノ酸種を変えたもの、アミノ酸種を固定し挿入箇所を変えたもの、別の基準（例えば、パニング）により選択したもの等）で集めたレク

チンの集合体は、よりの確に糖鎖を解析できるものとも考える。

【0077】

96 well-ELISA 用プレートに poly-L-lysine ($1\mu\text{g}/\text{well}$) をひき (37°C で 30 分間インキュベート)、細胞溶液 (10^5 cells/well; Collon-38, SL-4, Caco-2, 分化型 Caco-2) を加え、グルタルアルデヒド (glutaraldehyde (25%)) ($1\mu\text{g}/\text{well}$) によりこれをプレートへ固定 (室温で 30 分間静置) した。細胞を固定したプレートは TBS を入れて 4°C 保存し、更に、3%BSA/TBS でブロッキング (室温で 3 時間振盪) して、上で作製した改変 MAH レクチンを含むライセート ($50\mu\text{g}/\text{well}$) を加えた (室温で 2 時間振盪)。1 次抗体には、anti-FLAG M2 monoclonal 抗体 (1000 倍希釈を $50\mu\text{l}/\text{well}$)、2 次抗体には、HRP-goat anti-mouse IgG 抗体 (1000 倍希釈を $50\mu\text{l}/\text{well}$) を用いた (共に室温で 30 分間振盪)。ABTS/ H_2O_2 ($50\mu\text{l}/\text{well}$) で発色させ、 $\text{OD}_{405/490}$ を測定した。

【0078】

図 16 は、2 つの細胞 Colon-38、SL-4 の野生型及び改変 MAH の結合強度を示す。ある改変レクチンの各細胞 (Colon-38、SL-4) に対する結合性違いを示したものである。各改変レクチン (1Q, 2C, 3D, 3S, 4N) 毎に、性質の異なる 2 種類の細胞との結合性がそれぞれ違っていることがわかる。上述のように性質の異なる細胞との結合性が異なるのは、細胞表面の糖鎖の違いによるものと考えられ、従って、これらのレクチン群を用いれば、糖鎖若しくは細胞の特徴を判別できることになる。従って、最初に既知の糖鎖により、これらの改変レクチン群を分類し、それぞれの類を解析するための改変したレクチンの種類を選択しておけば、既知の糖鎖に基づいた糖鎖マッピングにおける未知の糖鎖の位置が判明すると考えられる。特に、Colon38 と SL-4 のように起源が同じ細胞等においても、それぞれ結合性が異なるレクチンが存在し、その差異を明確にできると考えられる。このように、120 種の改変レクチンを全て使って糖鎖解析をすることは、類似する糖鎖認識機能を有しながら、少しずつ異なると考えられるこれらのレクチンの集合により、多面的に未知の糖鎖を解析することができると考える。

【0079】

【発明の効果】

本発明により、レクチンライブラリが血清診断・細胞の種類・分化ステージなどの違いを反映し、診断方法として有用であることがわかった。そして、この新しい方法で細胞表面の糖鎖を分析することにより、遺伝子発現だけに依存していた細胞の同定が正確に行えることを意味し、細胞移植や細胞治療の開発に役立つと考える。また、本研究では人工レクチンライブラリをファージミド系ファージの表面に発現させることに成功した。改変レクチンライブラリから特異性の異なるものを選別する方法が確立したので、この系を用いて既存のレクチンやモノクローナル抗体にはない、新規な糖鎖特異性を有するものを得ることができると期待される。

【0080】

更に、本発明のレクチンライブラリを用いるとIgAのグライコフォームの検出や骨芽細胞亜集団の分別・同定するツールを提供することができる。即ち、IgAを含む各種血清蛋白質のグライコフォームの解析を簡便・迅速に診断する対外診断薬を提供することも可能であり、再生医療や細胞医療を実用化段階に移行させるために必要な細胞の品質保証を行う規格設計ツールを提供することも可能である。例えば、リウマチや自己免疫疾患時の免疫グロブリンのグライコシレーション、癌患者のある特定のホルモン（卵巣癌における絨毛性性腺刺激ホルモンの糖鎖変化）や蛋白質のグライコシレーション（肝炎から肝癌に至る際のアルファフェトプロテインの糖鎖変化）など、疾病の早期発見、病態の正確な把握、治療薬・予防薬への適用できる。

【0081】

種差に由来して産生されるのが抗体の特徴であるので、線維芽細胞に対する特異的抗体を作製することが困難なため、骨髓由来の線維芽細胞にはいわゆる細胞表面マーカーが存在せず、骨芽細胞を直接アッセイする方法はなく、現在のところ動物を用いたバイオアッセイもしくは骨芽細胞の活性度を反映する間接的なアッセイ法が主として用いられている分野においても、本発明のレクチンライブラリを用いたレクチンチップで、骨芽細胞の識別・同定、とくに分化ステージの異

なる亜集団を識別・同定することができると考えられる。同様のアプローチで骨髓由来樹状細胞および骨髓由来血管内皮細胞へ応用できる可能性がきわめて高く、再生医療で用いる細胞の品質確保のスタンダードツールとなりえる。

【0082】

現在の癌遠隔診断ネットワークにおいては病理診断が主体であるが、遺伝子発現情報を追加することが検討されており、O（オウ）ー結合型糖鎖が細胞間相互作用、細胞の浸潤、接着などに深く関与している知見も鑑み、糖鎖情報を追加することによって、より詳細な癌遠隔診断についての検討が可能となる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Irimura, Tatsuro

Matsumoto, Mariko

<120> Gene Mutant Lectin and Make Thereof

<130> SS1-006

<140>

<141> 2002-08-20

<160> 31

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1(MAH)

<211> 950

<212> DNA

<213> Maackia amurensis

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(858)

<223>

<400> 1

gcc atg gct act tcc aac tca aaa cca act caa gtc ctt ctt gcc acc

48

Met Ala Thr Ser Asn Ser Lys Pro Thr Gln Val Leu Leu Ala Thr

1	5	10	15	
ttc tta act ttc ttc ctt ttg cta ctc aac aac gta aac tca tca gat Phe Leu Thr Phe Phe Leu Leu Leu Leu Asn Asn Val Asn Ser Ser Asp				96
	20	25	30	
gag ctt tct ttt acc atc aac aat ttc atg cca aat caa ggc gat cta Glu Leu Ser Phe Thr Ile Asn Asn Phe Met Pro Asn Gln Gly Asp Leu				144
	35	40	45	
ctc ttc caa ggt gta gcc act gtt tca cca aca ggg gta tta caa ctt Leu Phe Gln Gly Val Ala Thr Val Ser Pro Thr Gly Val Leu Gln Leu				192
	50	55	60	
acc agc gaa gaa aac ggt caa ccc ctg gag tat tct gtt ggc aga gct Thr Ser Glu Glu Asn Gly Gln Pro Leu Glu Tyr Ser Val Gly Arg Ala				240
	65	70	75	
cta tat act gcc cct gtg cgc att tgg gac agt acc act ggc gcc gta Leu Tyr Thr Ala Pro Val Arg Ile Trp Asp Ser Thr Thr Gly Ala Val				288
80	85	90	95	
gca agc ttc tcc act tcc ttc acc ttt gtt gtg aaa gca gct agg gga Ala Ser Phe Ser Thr Ser Phe Thr Phe Val Val Lys Ala Ala Arg Gly				336
	100	105	110	
gct tct gac ggt tta gcc ttc ttt ctt gca cca cct gat tct cag atc Ala Ser Asp Gly Leu Ala Phe Phe Leu Ala Pro Pro Asp Ser Gln Ile				384
	115	120	125	

cct tcg ggc agc gta tcg aaa tac cta gga ctt ttt aac aac tca aat 432
Pro Ser Gly Ser Val Ser Lys Tyr Leu Gly Leu Phe Asn Asn Ser Asn

130

135

140

tcc gat agt tcc aac caa att gtt gct gta gag ttt gac act tac ttc 480
Ser Asp Ser Ser Asn Gln Ile Val Ala Val Glu Phe Asp Thr Tyr Phe

145

150

155

ggc cat agt tat gat ccc tgg gat cca aat tat cga cat atc gga att 528
Gly His Ser Tyr Asp Pro Trp Asp Pro Asn Tyr Arg His Ile Gly Ile

160

165

170

175

gat gtc aac ggt att gag tcg ata aaa act gtg caa tgg gat tgg att 576
Asp Val Asn Gly Ile Glu Ser Ile Lys Thr Val Gln Trp Asp Trp Ile

180

185

190

aac ggc gga gtt gcc ttt gct acc ata acc tat cta gct ccc aac aaa 624
Asn Gly Gly Val Ala Phe Ala Thr Ile Thr Tyr Leu Ala Pro Asn Lys

195

200

205

acg tta ata gca tct cta gtt tac cct tcc aat caa aca agt ttc att 672
Thr Leu Ile Ala Ser Leu Val Tyr Pro Ser Asn Gln Thr Ser Phe Ile

210

215

220

gtc gct gct tct gtt gat ttg aag gga atc ctc cct gag tgg gtt aga 720
Val Ala Ala Ser Val Asp Leu Lys Gly Ile Leu Pro Glu Trp Val Arg

225

230

235

gtt ggt ttc tct gct gcc acg ggt gct cct aaa gca gtt gaa acc cac 768
 Val Gly Phe Ser Ala Ala Thr Gly Ala Pro Lys Ala Val Glu Thr His
 240 245 250 255

gat gtt cgt tcc tgg tct ttc acg tca act ttg gaa gcc aac agc cct 816
 Asp Val Arg Ser Trp Ser Phe Thr Ser Thr Leu Glu Ala Asn Ser Pro
 260 265 270

gct gat gtg gat aat aat gtg cat atc gca cgt tac act gca 858
 Ala Asp Val Asp Asn Asn Val His Ile Ala Arg Tyr Thr Ala
 275 280 285

tgatctcgtg agctttcgta tgtattaggt gtttatgtaa attaaataaa aatgacctga 918

aataatgggt atcggcgcag ctatacaaaa at 950

<210> 2

<211> 285

<212> PRT

<213> Maackia amurensis

<400> 2

Met Ala Thr Ser Asn Ser Lys Pro Thr Gln Val Leu Leu Ala Thr Phe
 1 5 10 15

Leu Thr Phe Phe Leu Leu Leu Leu Asn Asn Val Asn Ser Ser Asp Glu
 20 25 30

Leu Ser Phe Thr Ile Asn Asn Phe Met Pro Asn Gln Gly Asp Leu Leu

35

40

45

Phe Gln Gly Val Ala Thr Val Ser Pro Thr Gly Val Leu Gln Leu Thr

50

55

60

Ser Glu Glu Asn Gly Gln Pro Leu Glu Tyr Ser Val Gly Arg Ala Leu

65

70

75

80

Tyr Thr Ala Pro Val Arg Ile Trp Asp Ser Thr Thr Gly Ala Val Ala

85

90

95

Ser Phe Ser Thr Ser Phe Thr Phe Val Val Lys Ala Ala Arg Gly Ala

100

105

110

Ser Asp Gly Leu Ala Phe Phe Leu Ala Pro Pro Asp Ser Gln Ile Pro

115

120

125

Ser Gly Ser Val Ser Lys Tyr Leu Gly Leu Phe Asn Asn Ser Asn Ser

130

135

140

Asp Ser Ser Asn Gln Ile Val Ala Val Glu Phe Asp Thr Tyr Phe Gly

145

150

155

160

His Ser Tyr Asp Pro Trp Asp Pro Asn Tyr Arg His Ile Gly Ile Asp

165

170

175

Val Asn Gly Ile Glu Ser Ile Lys Thr Val Gln Trp Asp Trp Ile Asn

180

185

190

Gly Gly Val Ala Phe Ala Thr Ile Thr Tyr Leu Ala Pro Asn Lys Thr
195 200 205

Leu Ile Ala Ser Leu Val Tyr Pro Ser Asn Gln Thr Ser Phe Ile Val
210 215 220

Ala Ala Ser Val Asp Leu Lys Gly Ile Leu Pro Glu Trp Val Arg Val
225 230 235 240

Gly Phe Ser Ala Ala Thr Gly Ala Pro Lys Ala Val Glu Thr His Asp
245 250 255

Val Arg Ser Trp Ser Phe Thr Ser Thr Leu Glu Ala Asn Ser Pro Ala
260 265 270

Asp Val Asp Asn Asn Val His Ile Ala Arg Tyr Thr Ala
275 280 285

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Tag Primer pFLAG-Spe I-sense

<400> 3

ccgggtacct gcactagtag atagatgagc tc

32

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Tag Primer FLAG-Spe I-anti

<400> 4

gagctcatct atctactagt gcaggtaccc gg

32

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pFLAG-XhoI

<400> 5

ccaggtgaaa ctgctcgagt cagatg

32

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer MAH-Spe I-anti

<400> 6

tgggcaacta gttgcagtg aacgtgcg

28

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Analyzing Primer N-26

<400> 7

catcataacg gttctggcaa atattc

26

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequence Primer Loop D-Seq

<400> 8

gttaatagca tctctagttt accc

24

<210> 9

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Inert Primer LLD3

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(35)

<223> n is a or c or g or t or u.

<220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> m is a or c.

<400> 9

ctacaagatc taacatcgtg ggtttcaact gcmnttttag gagcacccgt ggcagcaga 59

<210> 10

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Insert Primer LLD4

<220>

<221> misc_feature

<222> (37)..(38)

<223> n is a or c or g or t or u.

<400> 10

ctacaagatc taacatcgtg ggtttcaact gctttmnag gagcacccgt ggcagcaga 59

<210> 11

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Insert Primer LLD5

<220>

<221> misc_feature

<222> (40)..(41)

<223> n is a or c or g or t or u.

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> m is a or c.

<400> 11

ctacaagatc taacatcgtg gggtttcaact gcttttaggm naggcaccgt ggcagcaga 59

<210> 12

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Insert Primer LLD6

<220>

<221> misc_feature

<222> (43)..(44)

<223> n is a or c or g or t or u.

<220>

<221> misc_feature

<222> (42)..(42)

<223> m is a or c.

<400> 12

ctacaagatc taacatcgtg gggtttcaact gcttttaggag cmnnaccgt ggcagcaga 59

<210> 13

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Insert Primer MAH loop D-1 Phe

<400> 13

ctacaagatc taacatcgtg ggtttcaaaa actgcttttag gagcacccgt ggcagcaga 59

<210> 14

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Insert Primer MAH loop D-2 Asp

<400> 14

ctacaagatc taacatcgtg ggtttcaaca tctgcttttag gagcacccgt ggcagcaga 59

<210> 15

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Insert Primer MAH loop D-3 Cys

<400> 15

ctacaagatc taacatcgtg ggtttcaact gcacatttag gagcacccgt ggcagcaga 59

<210> 16

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Insert Primer MAH loop D-4 Asp

<400> 16

ctacaagatc taacatcgtg ggtttcaact gctttatcag gagcacccgt ggcagcaga 59

<210> 17

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Insert Primer MAH loop D-6 Phe

<400> 17

ctacaagatc taacatcgtg ggtttcaact gctttaggag caaaacccgt ggcagcaga 59

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer EcoRI-S

<400> 18

ccgatagttc caaccaaatt gttgctgtag aattcgacac

40

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> BamHI reverse primer

<400> 19

cacaaacgaa tggggatcca c

21

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> N-Flag-XhoI primer

<400> 20

ccaggtgaaa ctgctcgagt cagatg

26

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Antisense primer Flag-Sal I for PCR

<400> 21

gtggtcgact gcagtgtaac gtg

23

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Clone 1

<400> 22

Asp Thr Tyr Phe Gly His Gly Tyr Asp Pro Trp

1

5

10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Clone 2

<400> 23

Asp Thr Tyr Phe Arg His Asn Tyr Asp Pro Trp

1

5

10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Clone 3

<400> 24

Asp Thr Tyr Phe Ser His Asn Tyr Asp Pro Trp

1

5

10

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Clone 4

<400> 25

Asp Thr Tyr Phe Gly His Arg Tyr Asp Pro Trp

1

5

10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Clone 5

<400> 26

Asp Thr Tyr Phe Gly His Val Tyr Asp Pro Trp

1

5

10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Clone 6

<400> 27

Asp Thr Tyr Phe Ala His Asn Tyr Asp Pro Trp

1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Clone 7

<400> 28

Asp Thr Tyr Phe Gly His Leu Tyr Asp Pro Trp

1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Clone 8

<400> 29

Asp Thr Tyr Phe Gly His Asp Tyr Asp Pro Trp

1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Clone 9

<400> 30

Asp Thr Tyr Phe Tyr His Asn Tyr Asp Pro Trp

1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Clone 10

<400> 31

Asp Thr Tyr Phe Gly His Trp Tyr Asp Pro Trp

1 5 10

【図面の簡単な説明】

【図 1】 MAHの立体構造の予測図である。

【図 2】 MAHをコードした cDNA の塩基配列と予想されるアミノ酸配

列を示した図である。

【図3】 野生型イヌエンジュマメレクチン (MAH) の認識する糖鎖構造である。

【図4】 IgA1糖鎖構造のバラエティを図解する図である。

【図5】 MAHのループCのアミノ酸配列を示し、改変によるアミノ酸の挿入位置を示した図である。

【図6】 ファージディスプレイ型レクチンライブラリの概略である。

【図7】 パニングによる人工レクチンの回収手順である。

【図8】 細胞表面に発現している糖鎖を模式的に示した図である。

【図9】 糖鎖グライコフォームの異なるIgAの識別および間葉系幹細胞由来の細胞の亜集団識別に用いたレクチンライブラリに含まれるレクチンのアミノ酸配列を示す図である。

【図10】 ヒト赤血球によるパニングにより得られたクローンの糖鎖特異性を示す図である。

【図11】 レクチンチップの一例およびその使用方法 (IgAについて) を示す図である。

【図12】 糖鎖グライコフォームの異なるIgAのレクチンライブラリに対する結合パターンを示す図である。

【図13】 レクチンチップの一例およびその使用方法 (骨芽細胞の分化度プロファイリングについて) を示す図である。

【図14】 間葉系幹細胞由来細胞の亜集団のレクチンライブラリにおける結合パターンを示す図である。

【図15】 MAHのループDのアミノ酸配列を示し、改変によるアミノ酸の挿入位置を示した図である。

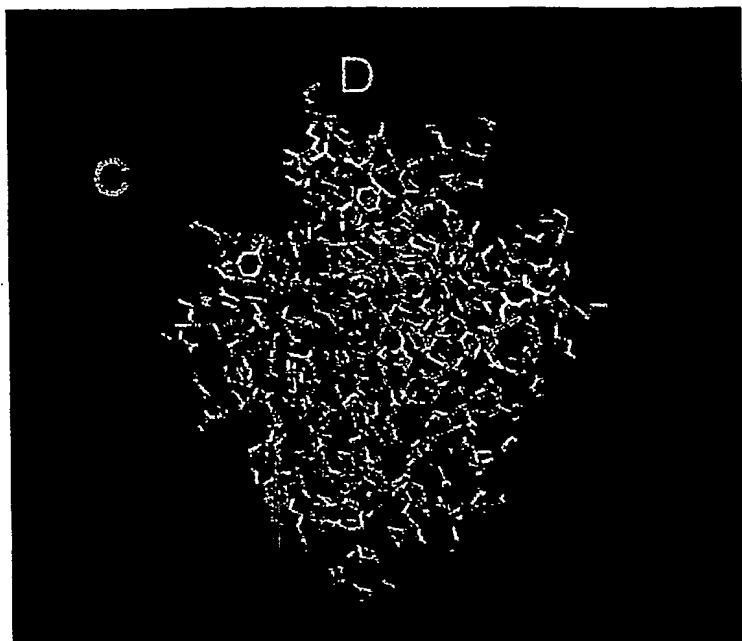
【図16】 転移性の異なる癌細胞のレクチンライブラリに対する結合パターンを示す図である。

【書類名】

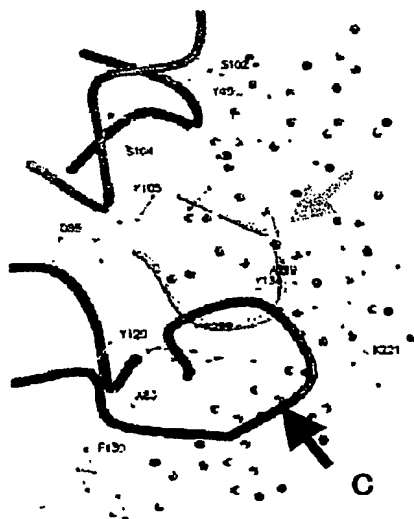
図面

【図1】

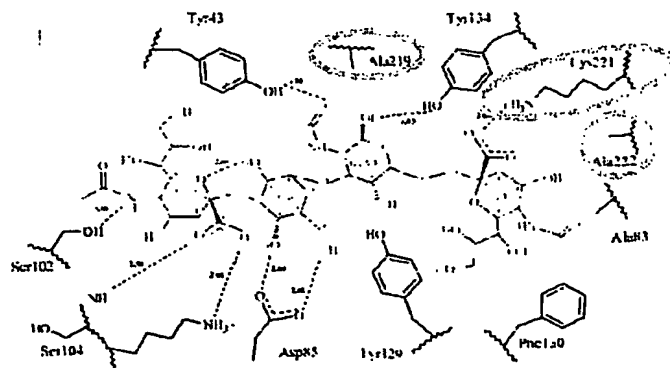
A



B



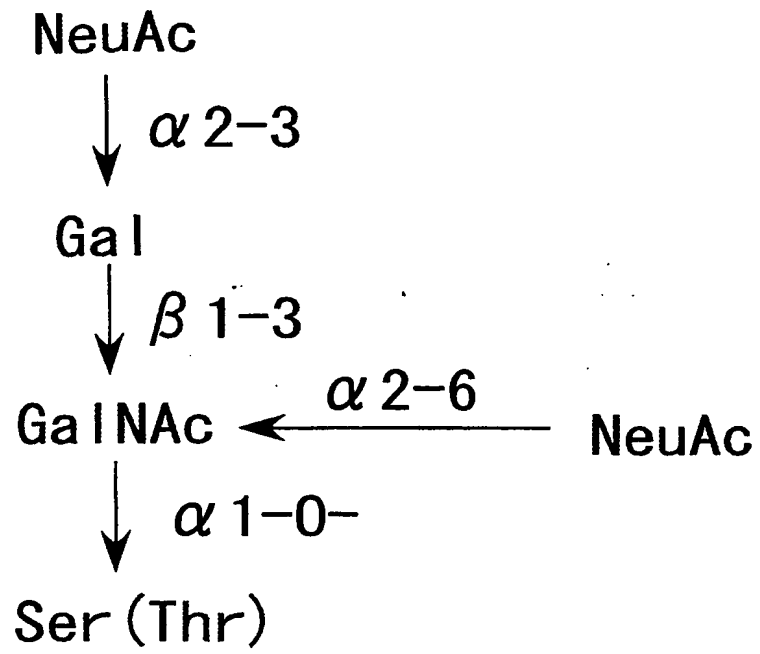
C



【図 2】

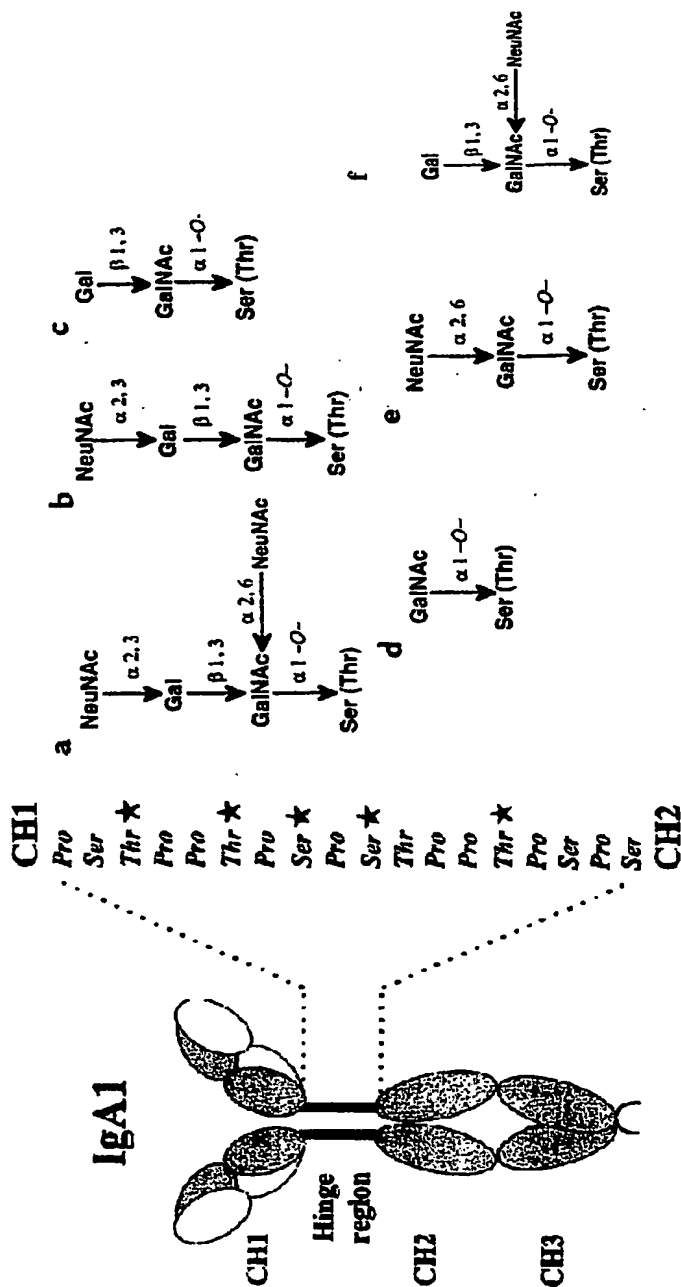
10 20 30 40 50 60
gccatggctacttccaactcaaaaccaactcaagtccttcttgccaccttcttaactttc
M A T S N S K P T Q V L L A T F L T F
70 80 90 100 110 120
ttccttttgctactcaacaacgtactca^①tcagatgagcttttctttaccatcaacaat
F L L L L N N V N S S D E L S F T I N N
130 140 150 160 170 180
ttcatgccaaatcaaggcgatctactcttccaagggtgtagccactgtttcaccaacaggg
F M P N Q G D L L F Q G V A T V S P T G
190 200 210 220 230 240
gtattacaacttaccagcgaagaaaacgggtcaacccctggagtattctgttggcagagct
V L Q L T S E E N G Q P L E Y S V G R A
250 260 270 280 290 300
ctatatactgcccctgtgcgcat^②ttgggaagtagcactggcgccgtagcaagcttctcc
L Y T A P V R I W D S T T G A V A S F S
310 320 330 340 350 360
acttccttcacctttgtgtgaaagcagctaggggagcttctgacgggttagccttcttt
T S F T F V V K A A R G A S D G L A F F
370 380 390 400 410 420
cttgaccacctgattctcagatcccttcgggcagcgtatcgaataacctaggacttttt
L A P P D S Q I P S G S V S K Y L G L F
430 440 450 460 470 480
aacaactcaaatccgatagttccaaccaaattgttgctgtagagtttgacacttacttc
N N S N S D S S N Q I V A V E F D T Y F
490 500 510 520 530 540
ggccatagttatgatccctgggatccaaattatcgacatatcggaattgatgtcaacggg
G H S Y D P W D P N Y R H I G I D V N G
550 560 570 580 590 600
attgagtcgataaaaactgtgcaatgggattggattaacggcgagggtgcctttgtctacc
I E S I K T V Q W D W I N G G V A F A T
610 620 630 640 650 660
ataacctatctagctcccaacaaaacggttaatagcatctctagtttacccttccaatcaa
I T Y L A P N K T L I A S L V Y P S N Q
670 680 690 700 710 720
acaagtttcattgtcgctgcttctgttgattgaaggggaatcctccctgagtgggttaga
T S F I V A A S V D L K G I L P E W V R
730 740 750 760 770 780
gttgggttctctgctgccacgggtgctcctaaagcagttgaaacccacgatgtt^③cgttcc
V G F S A A T G A P K A V E T H D V R S
790 800 810 820 830 840
tggtctttcacgtcaactttggaagccaacagccctgctgatgtggataataatgtgcat
W S F T S T L E A N S P A D V D N N V H
850 860 870 880 890 900
atcgacgttacactgc^④aatctcgtgagctttcgtatgtattaggtgtttatgtaaat
I A R Y T A *
910 920 930 940 950
taataaaaaatgacctgaataaatggttatcggcgagctatacaaaaat

【図3】



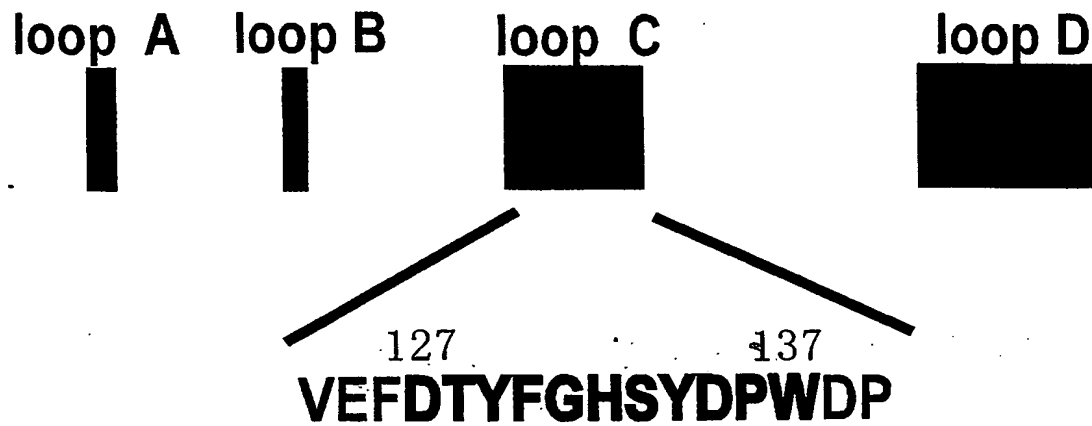
【図 4】

IgA1・糖鎖構造のバリエーティ ヒンジ部分のSer残基、Thr残基へのO-結合型糖鎖の結合1



7,776 通りのバリエーション

【図 5】



Extension

FDTYFGHSDPWD

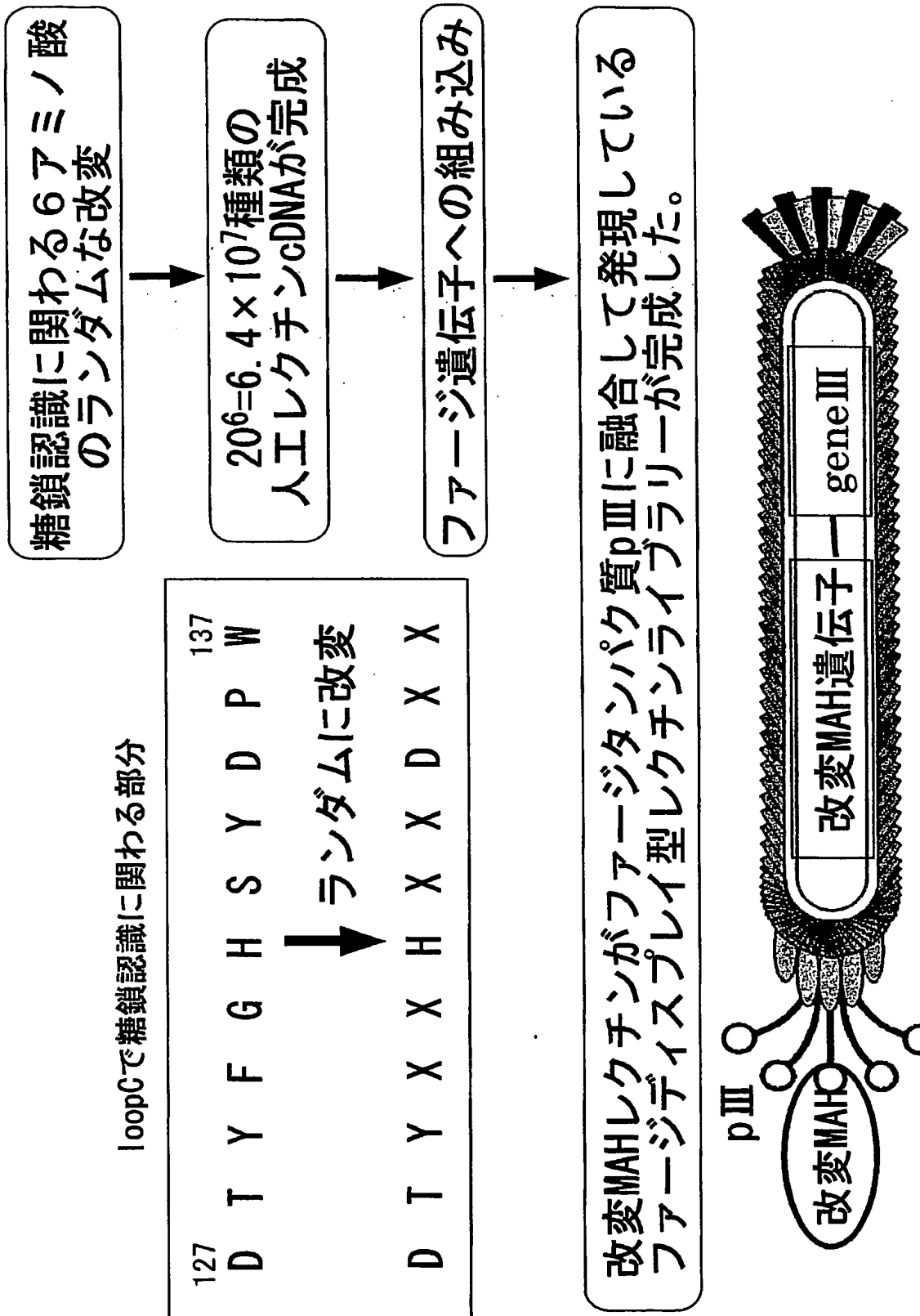
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



ex.

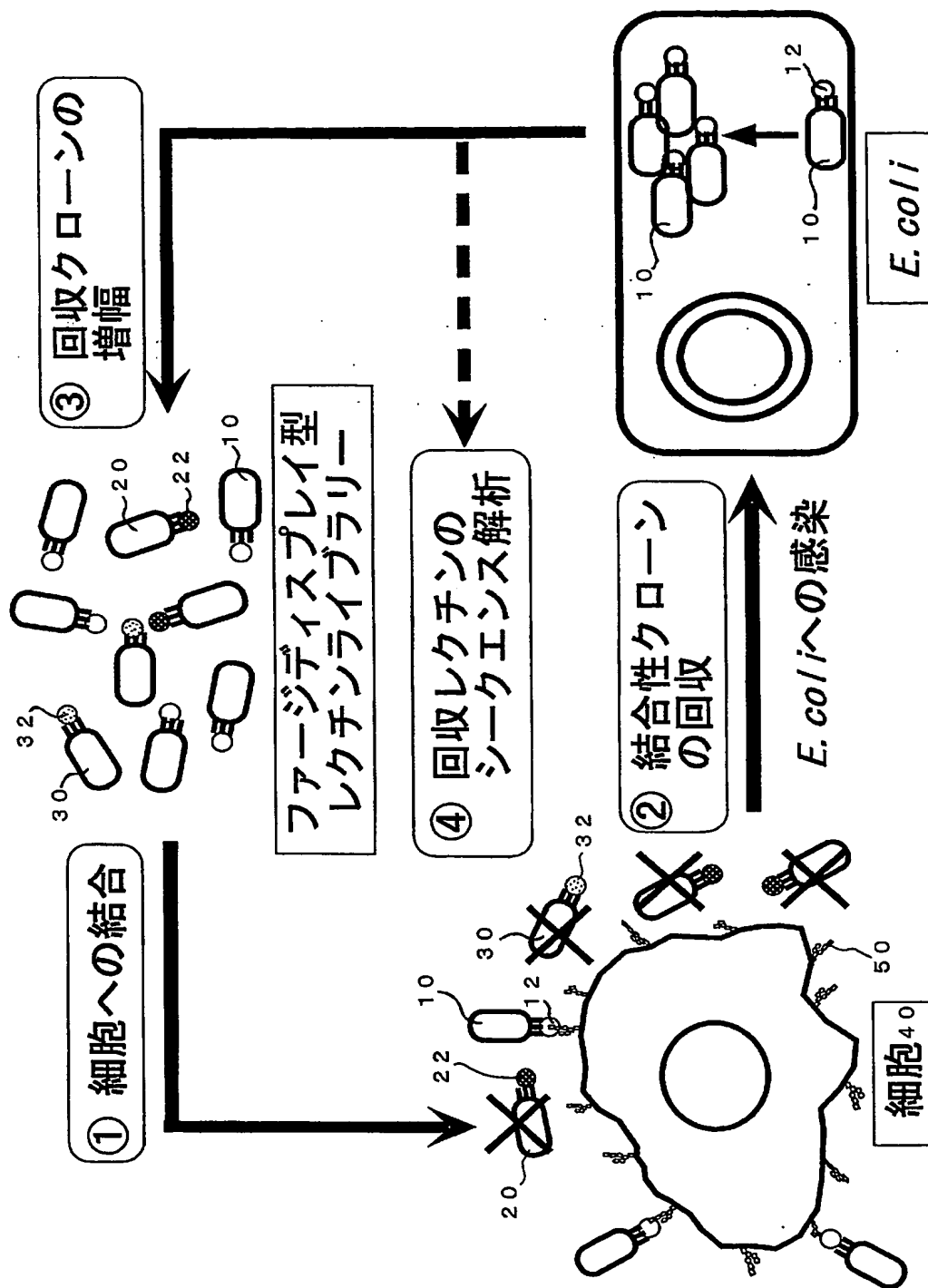
FDTYFGHSDPXD

【図 6】

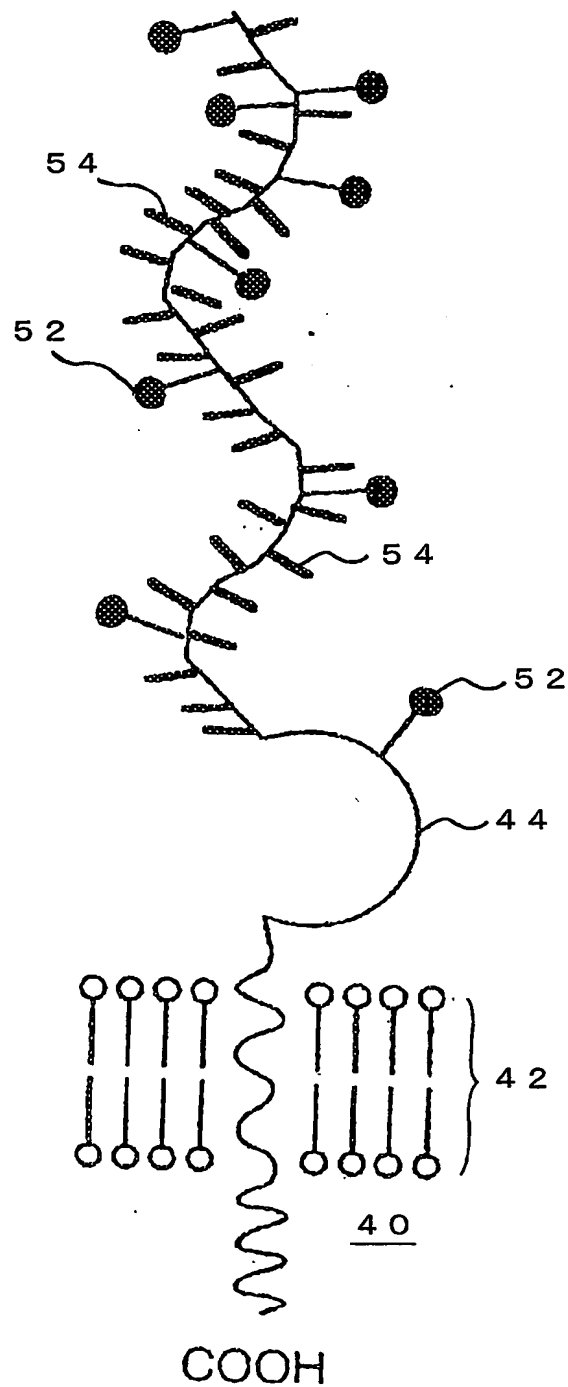


【図7】

panningによる多数の人工レクチンの回収



【図 8】



膜貫通型CD34糖タンパク質の構造

【図 9】

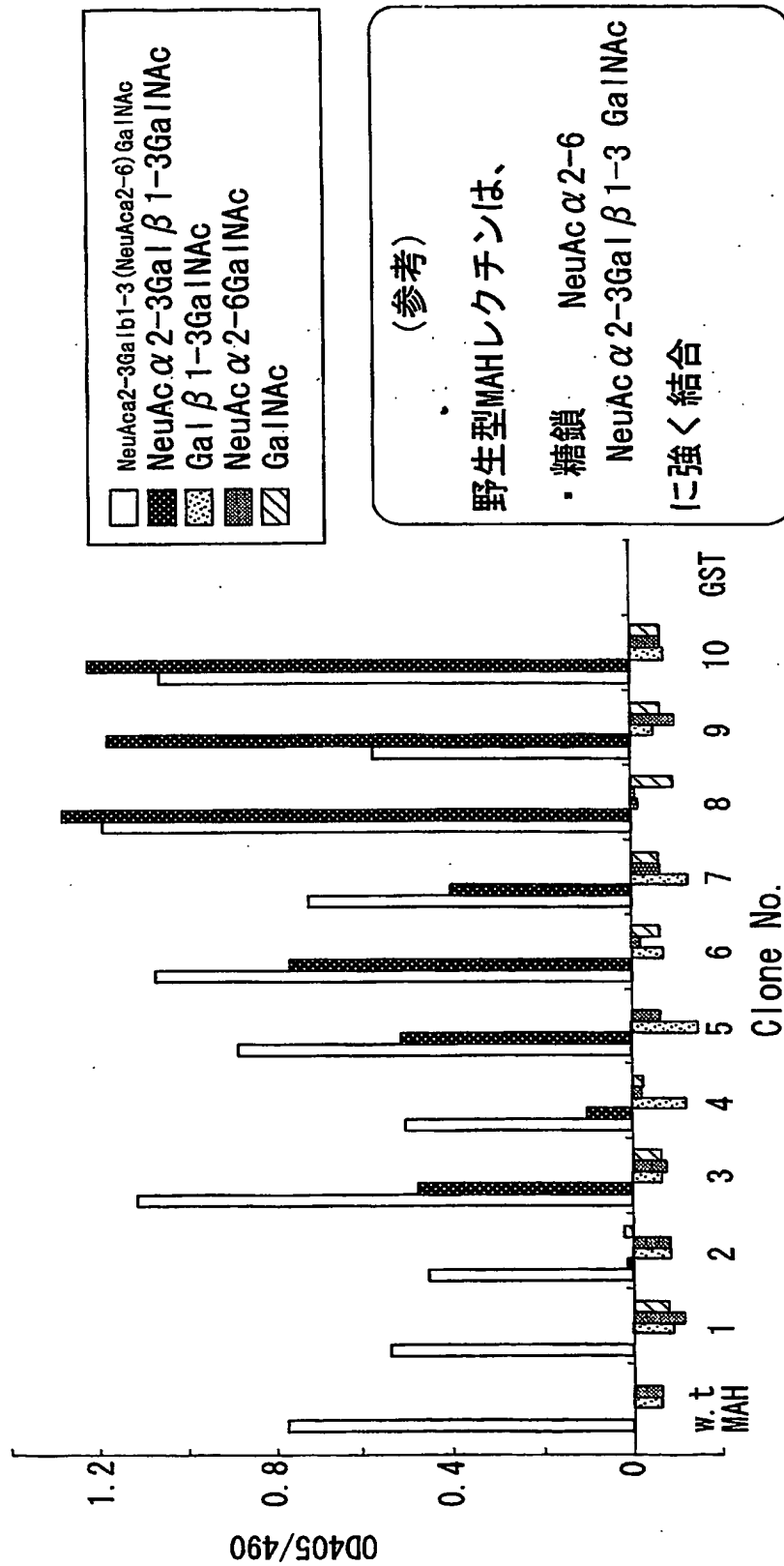
127

135

wild-type	Asp	Thr	Tyr	Phe	Gly	His	Ser	Tyr	Asp	Pro	Trp
clone 1	Asp	Thr	Tyr	Phe	Gly	His	Gly	Tyr	Asp	Pro	Trp
clone 2	Asp	Thr	Tyr	Phe	Arg	His	Asn	Tyr	Asp	Pro	Trp
clone 3	Asp	Thr	Tyr	Phe	Ser	His	Asn	Tyr	Asp	Pro	Trp
clone 4	Asp	Thr	Tyr	Phe	Gly	His	Arg	Tyr	Asp	Pro	Trp
clone 5	Asp	Thr	Tyr	Phe	Gly	His	Val	Tyr	Asp	Pro	Trp
clone 6	Asp	Thr	Tyr	Phe	Ala	His	Asn	Tyr	Asp	Pro	Trp
clone 7	Asp	Thr	Tyr	Phe	Gly	His	Leu	Tyr	Asp	Pro	Trp
clone 8	Asp	Thr	Tyr	Phe	Gly	His	Asp	Tyr	Asp	Pro	Trp
clone 9	Asp	Thr	Tyr	Phe	Tyr	His	Asn	Tyr	Asp	Pro	Trp
clone 10	Asp	Thr	Tyr	Phe	Gly	His	Trp	Tyr	Asp	Pro	Trp

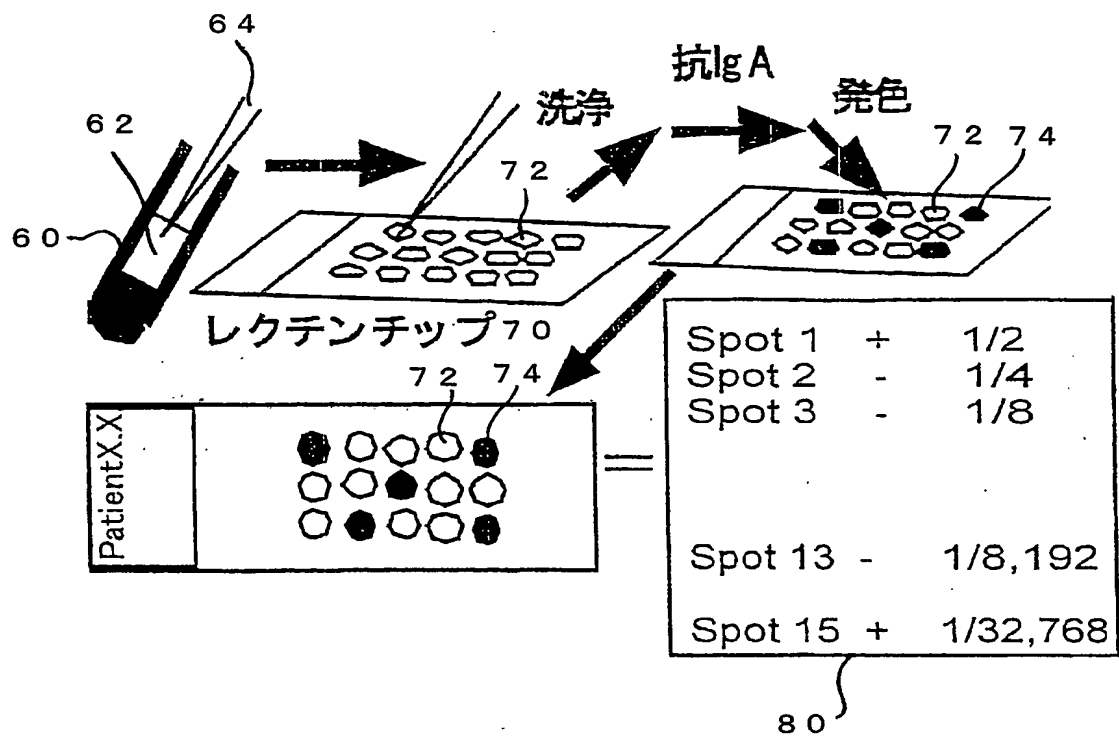
ヒト赤血球を用いて回収したレクチンの
改変した糖鎖認識部位のアミノ酸配列

【図10】



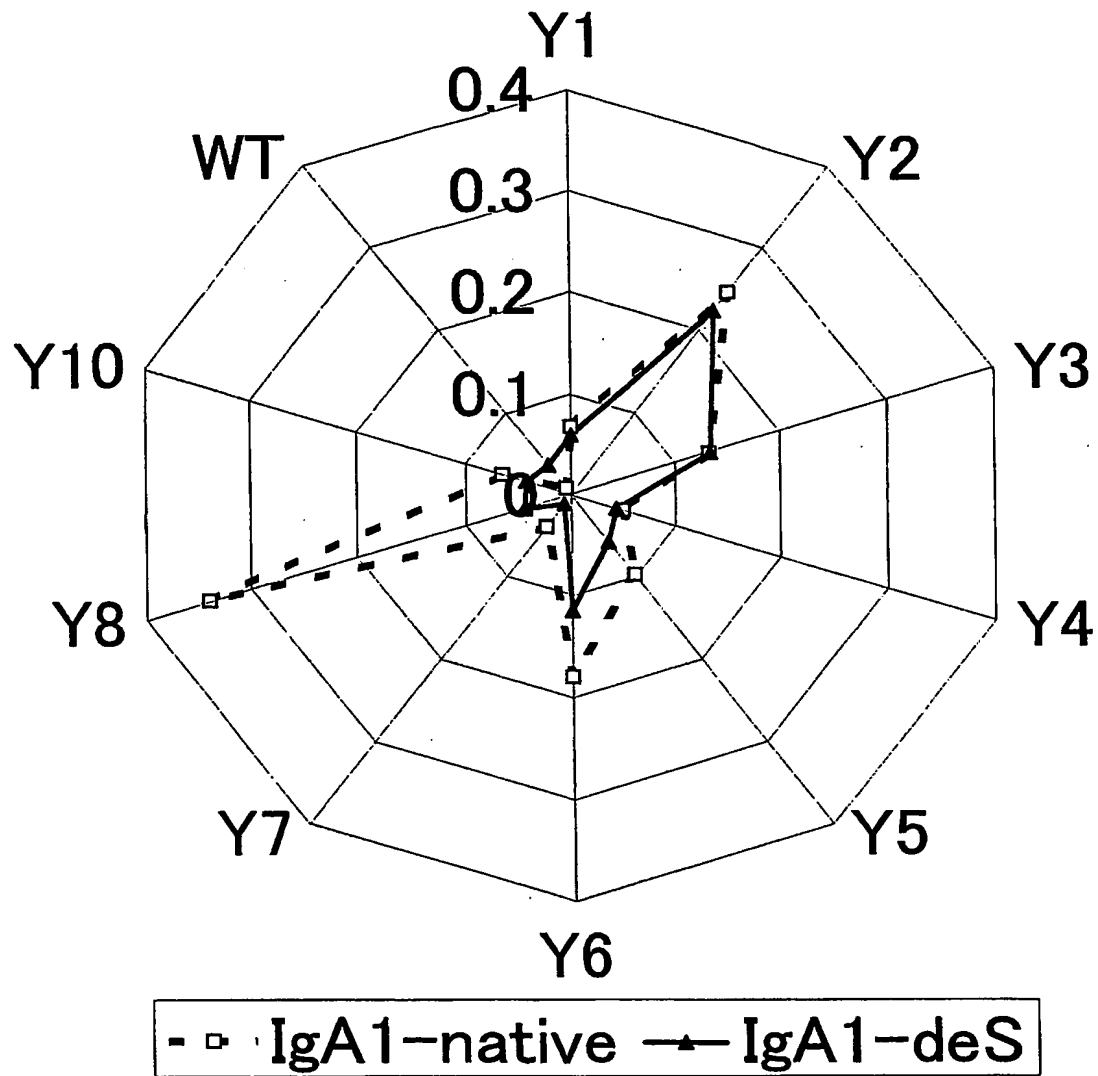
ヒト赤血球を用いて回収したレクチンの
結合型各種糖鎖との結合特異性

【図 11】

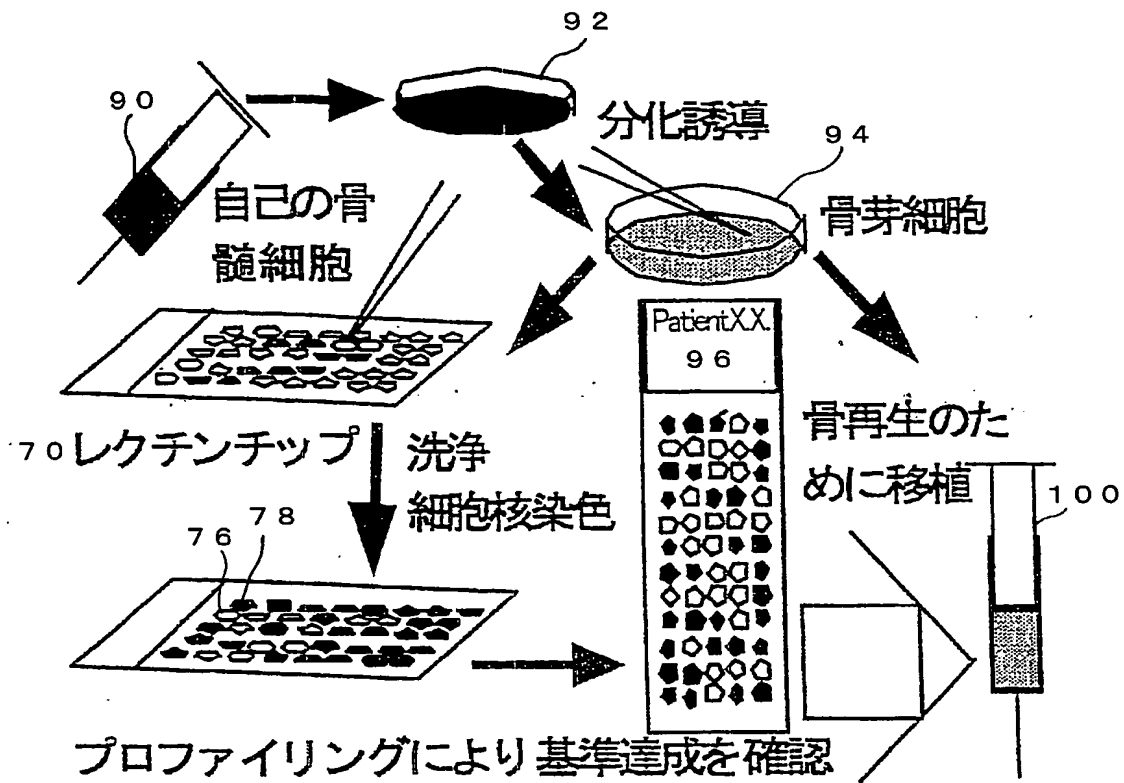


【図12】

LoopC赤血球パニング

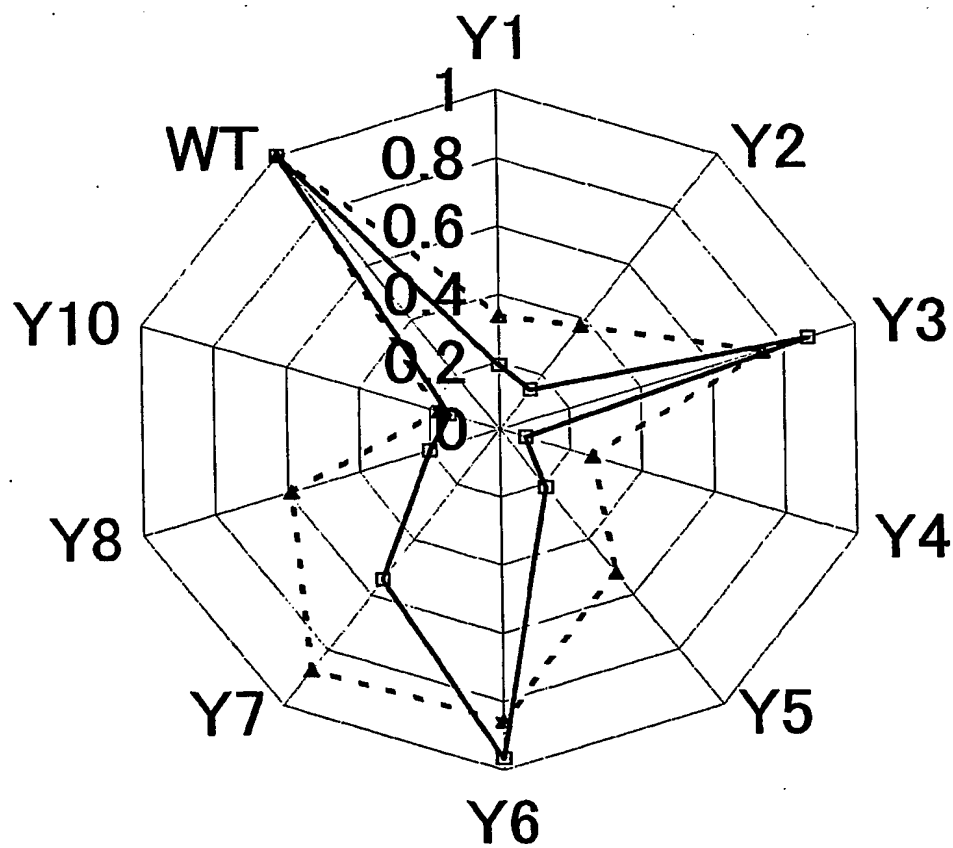


【図13】



【図14】

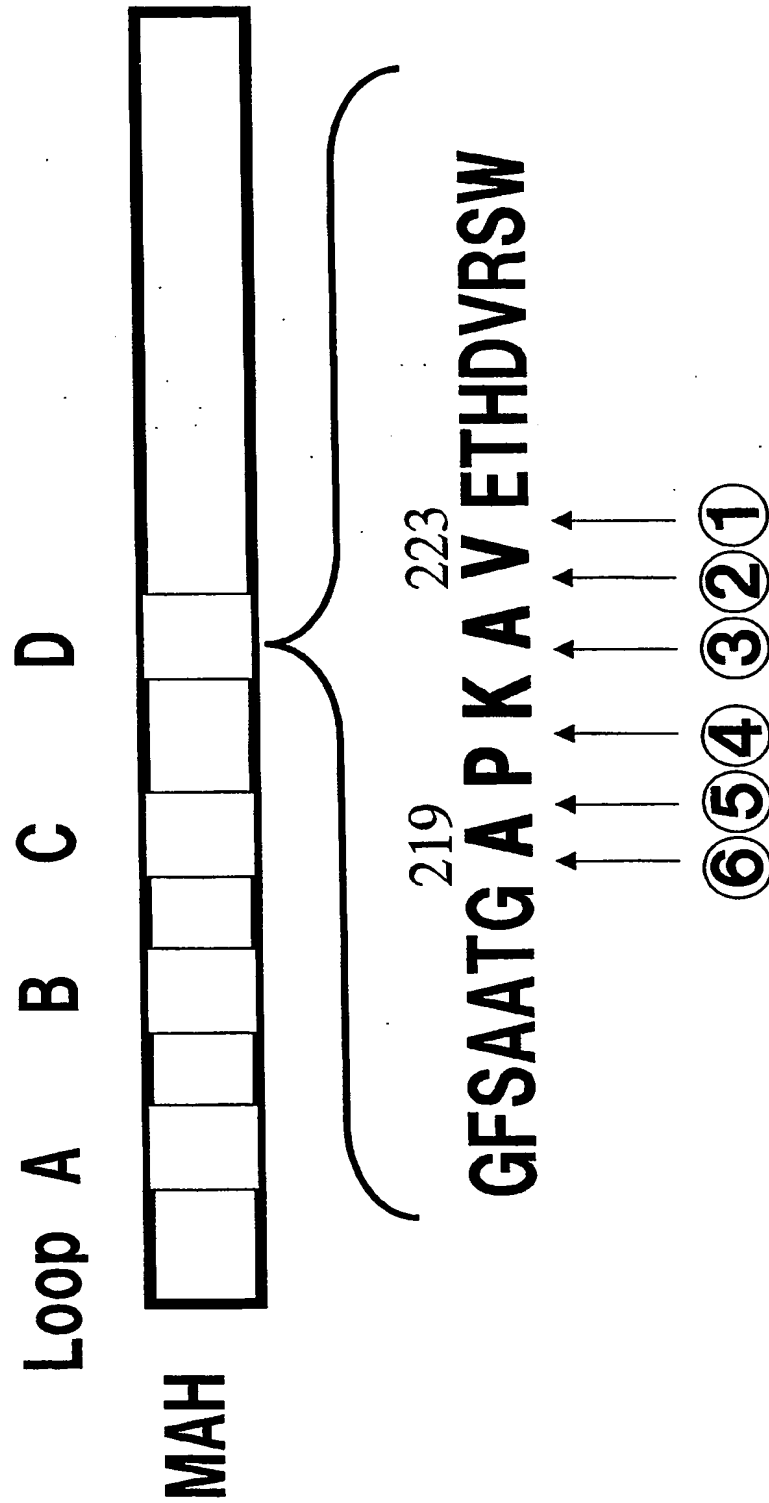
LoopC赤血球パニング



—■— KUSA/A1 -▲- 9-15C

【図 15】

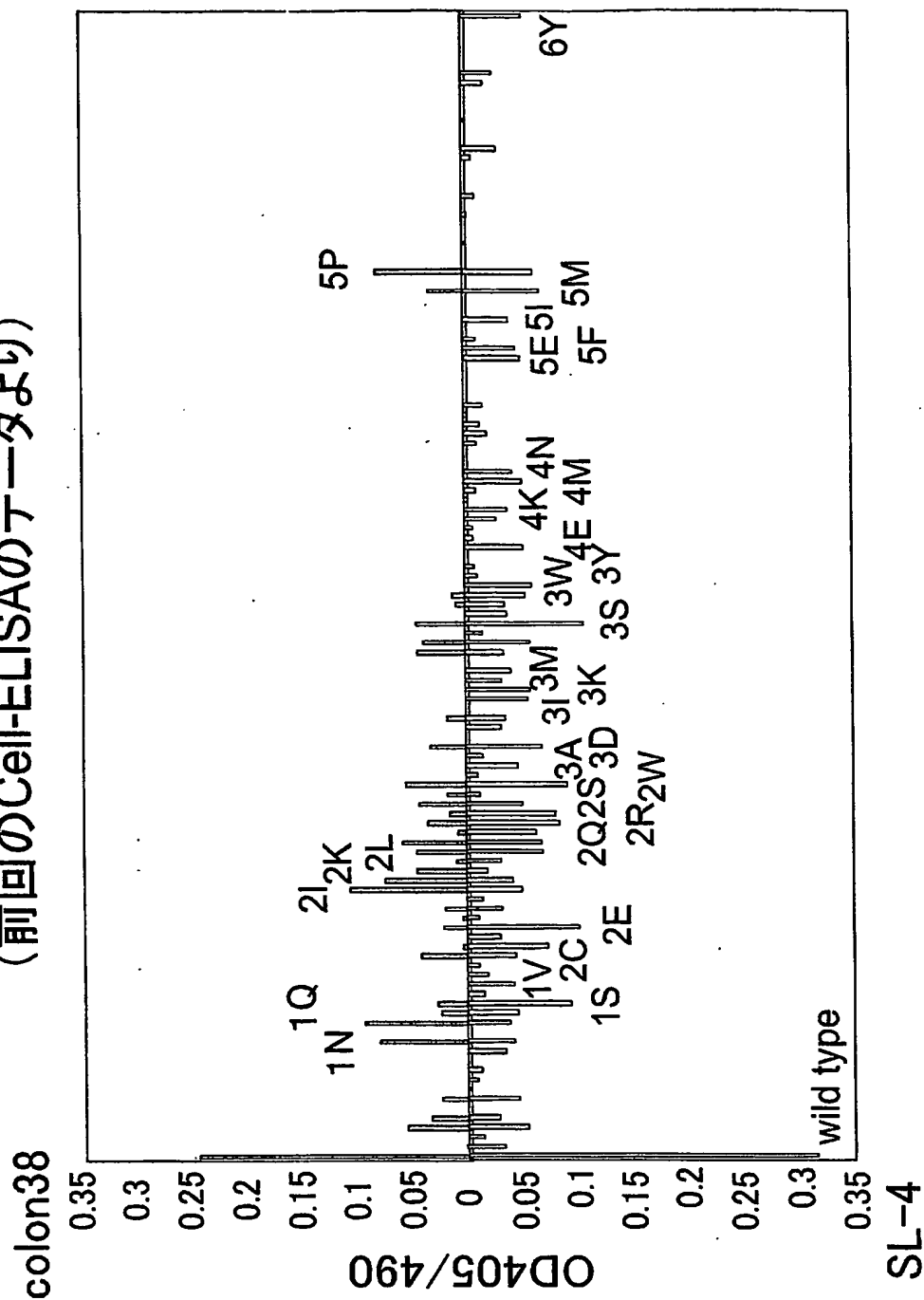
MAH Loop Dへのアミノ酸の 挿入位置



【図 16】

colon38とSL-4への結合

(前回のCell-ELISAのデータより)



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 微妙な違いのある糖鎖を有する細胞等を区別する解析用レクチンを調整する方法及その方法で調整されたレクチンを提供することである。

【解決手段】 複数の種類のレクチンから所定の細胞等によるパニング又はその他の方法で、所定の解析能を有するレクチンを選別する。所定の解析能には、解析すべき細胞等と親和性が高いことと低いことを含むことができる。このようにして選別された1又はそれ以上のレクチンを用いて細胞等の解析を行うことができる。更に、これらのレクチンを含んだ診断薬又は診断キットを提供することができる。

【選択図】 図7

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-239979
受付番号	50201231566
書類名	特許願
担当官	長谷川 実 1921
作成日	平成14年 8月21日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 501069968

【住所又は居所】 東京都世田谷区桜新町2丁目27番9号 603号室

【氏名又は名称】 入村 達郎

【特許出願人】

【識別番号】 501069979

【住所又は居所】 神奈川県川崎市幸区小倉1丁目1番E棟216号

【氏名又は名称】 松本 真理子

【代理人】 申請人

【識別番号】 100106002

【住所又は居所】 東京都豊島区南池袋3-18-34 池袋シティ
ハイツ701 正林国際特許事務所

【氏名又は名称】 正林 真之

次頁無

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 47702
【提出日】 平成15年 8月13日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2002-239979
【補正をする者】
【識別番号】 501069968
【氏名又は名称】 入村 達郎
【補正をする者】
【識別番号】 000002129
【氏名又は名称】 住友商事株式会社
【代理人】
【識別番号】 100062007
【住所又は居所】 東京都新宿区新宿 1 丁目 1 番 1 1 号 友泉新宿御苑ビル 川口國
際特許事務所
【弁理士】
【氏名又は名称】 川口 義雄
【電話番号】 03(3354)8623
【手続補正1】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 発明者
【補正方法】 変更
【補正の内容】
【発明者】
【住所又は居所】 東京都世田谷区桜新町 2 丁目 2 7 番 9 号 6 0 3 号室
【氏名】 入村 達郎
【発明者】
【住所又は居所】 東京都杉並区和田 2 - 4 5 - 9 メゾンドスサーナ 1 0 6
【氏名】 前沼 圭佐
【発明者】
【住所又は居所】 東京都目黒区洗足 1 - 1 1 - 1 5 木原方
【氏名】 小松 邦光
【発明者】
【住所又は居所】 千葉県美浜区真砂 3 - 1 8 - 3 - 9 0 6
【氏名】 立木 あゆ美
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市幸区小倉 1 丁目 1 番 E 棟 2 1 6 号
【氏名】 松本 真理子
【その他】 第 4 発明者「立木 あゆみ」の氏名が正しくは「立木 あゆ美」
と判明したので補正する。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-239979
受付番号	50301343762
書類名	手続補正書
担当官	田丸 三喜男 9079
作成日	平成 15 年 8 月 18 日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】

501069968

【住所又は居所】

東京都世田谷区桜新町 2 丁目 27 番 9 号 603
号室

【氏名又は名称】

入村 達郎

【補正をする者】

【識別番号】

000002129

【住所又は居所】

東京都中央区晴海一丁目 8 番 11 号

【氏名又は名称】

住友商事株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100062007

【住所又は居所】

東京都新宿区新宿 1 丁目 1 番 11 号 友泉新宿御
苑ビル 川口国際特許事務所

【氏名又は名称】

川口 義雄

【書類名】 出願人名義変更届

【提出日】 平成14年12月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2002-239979

【承継人】

【識別番号】 000002129

【氏名又は名称】 住友商事株式会社

【承継人代理人】

【識別番号】 100106002

【弁理士】

【氏名又は名称】 正林 真之

【承継人代理人】

【識別番号】 100116872

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 和子

【承継人代理人】

【識別番号】 100111707

【弁理士】

【氏名又は名称】 相川 俊彦

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 058975

【納付金額】 4,200円

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-239979
受付番号	50201870556
書類名	出願人名義変更届
担当官	森吉 美智枝 7577
作成日	平成15年 6月 5日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	000002129
【住所又は居所】	東京都中央区晴海一丁目8番11号
【氏名又は名称】	住友商事株式会社

【承継人代理人】

申請人

【識別番号】	100106002
【住所又は居所】	東京都豊島区南池袋3-18-34 池袋シテイ ハイツ701 正林国際特許事務所

【氏名又は名称】	正林 真之
----------	-------

【承継人代理人】

【識別番号】	100116872
【住所又は居所】	東京都豊島区南池袋3丁目18番34号 池袋シ ティハイツ604号 エルアイエル国際特許事務 所

【氏名又は名称】	藤田 和子
----------	-------

【承継人代理人】

【識別番号】	100111707
【住所又は居所】	東京都豊島区南池袋3丁目18番34号 池袋シ ティハイツ701号 正林国際特許事務所

【氏名又は名称】	相川 俊彦
----------	-------

次頁無

特願 2002-239979

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[501069968]

1. 変更年月日

2001年 2月20日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都世田谷区桜新町2丁目27番9号 603号室

氏 名

入村 達郎

特願 2002-239979

出願人履歴情報

識別番号

[501069979]

1. 変更年月日

2001年 2月20日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県川崎市幸区小倉1丁目1番E棟216号

氏 名

松本 真理子

特願 2002-239979

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[00000212.9]

1. 変更年月日

2001年 8月 1日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区晴海一丁目8番11号

氏 名

住友商事株式会社